

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Microbiología III**



**CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE  
“PHACODINIUM METCHNIKOFFI”: ANÁLISIS  
COMPARATIVO DE DATOS MORFOLÓGICOS,  
MORFOGENÉTICOS Y MOLECULARES.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Pilar Calvo de Pablo**

Bajo la dirección de la doctora

Susana Serrano Barrero

**Madrid, 2010**

- **ISBN: 978-84-693-1107-3**



**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE  
*Phacodinium metchnikoffi*:  
ANÁLISIS COMPARATIVO DE DATOS  
MORFOLÓGICOS, MORFOGENÉTICOS Y  
MOLECULARES**

Tesis doctoral que presenta Pilar Calvo de Pablo  
para optar al grado de doctor en Ciencias Biológicas

Vº Bº Directora:

Dra. Susana Serrano Barrero

**Pilar Calvo de Pablo**

**Madrid 2009**

## *AGRADECIMIENTOS*

*Me gustaría recordar en este apartado a las siguientes personas, con quienes he adquirido una deuda de gratitud:*

*\*A todos los que creyeron que este proyecto era viable y siempre tuvieron palabras de aliento y ánimo: familiares, compañeros de instituto, compañeros del departamento de Microbiología y otros compañeros de la facultad, a los grandes amigos. Nombrar a todos sería difícil; espero que os veáis reconocidos.*

*\*A los investigadores y profesores que respaldaron el proyecto con su apoyo y trabajo: al profesor don Dimas Fernández-Galiano, mi gran maestro; a las profesoras Susana Serrano, mi directora de tesis, y Almudena Guinea, que me acompañó en distintas etapas de este trabajo; al grupo de investigación de la Universidad de Orsay (Paris), liderado por A. Adoutte, quien fue un gran entusiasta del proyecto y me permitió trabajar en su laboratorio junto a A. Baroin, A. Fleury y F. Iftode; asimismo, al profesor Antonio Torres, de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla, por permitirme trabajar en su laboratorio junto al profesor Eduardo Villalobo, quien me mostró una atención y disposición continua; y por último, a Antonio Ferraz Martínez, por su ayuda más incondicional. He aprendido mucho de todos ellos, lo que ha sido una experiencia determinante en mi vida.*

*\*A los grandes profesores, que son modelos académicos y de valores, que disfrutaban aprendiendo y transmitiéndoselo a sus alumnos.*

*\*A mi hijo Daniel, el mejor aliento en estos últimos años.*

## ÍNDICE

---





<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Importancia de la sistemática en la investigación sobre ciliados: necesidad de enfoques complementarios	3
1.2. Principales hitos en la sistemática de los ciliados	4
1.2.1. Microscopía óptica	4
1.2.2. Microscopía electrónica	6
1.2.3. Estudios moleculares	12
1.2.3.1. ARNr 18S y 28S	12
1.2.3.2. Proteínas citoesqueléticas como marcadores filogenéticos	24
1.3. Antecedentes en la literatura científica sobre la especie estudiada	27
<b>II. OBJETIVOS DE LA TESIS</b>	<b>33</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>37</b>
3.1. Material biológico	39
3.1.1. Procedencia y condiciones de cultivo	39
3.1.2. Condiciones de enquistamiento y preparación de quistes de resistencia	39
3.2. Técnicas morfológico-citológicas	40
3.2.1. Observación “in vivo”	40
3.2.2. Observación con microscopía óptica	40
3.2.3. Observación con microscopía electrónica	43
3.3. Métodos de análisis molecular	45
3.3.1. Aislamiento de ácidos nucleicos	45
3.3.2. Medidas de la concentración y pureza de los ácidos nucleicos	46
3.3.2.1. Fase previa a la electroforesis	46



3.3.2.2. Realización de la electroforesis de ADN	47
3.3.3. Amplificación del ADN por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	47
3.3.3.1. Diseño de cebadores	47
3.3.3.2. Condiciones de amplificación	48
3.3.4. Purificación del ADN a partir de geles de agarosa	49
3.3.5. Clonación.	49
3.3.5.1. Preparación de la ligación	49
3.3.5.2. Preparación de células competentes	51
3.3.5.3. Transformación	51
3.3.6. Extracción del ADN plasmídico	51
3.3.7. Secuenciación del ADN y análisis de secuencias	52
3.3.8. Construcción de árboles filogenéticos	54
3.3.9. Tratamiento informático en la construcción de árboles filogenéticos	55
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>57</b>
4.1. La célula vegetativa	59
4.1.1. Morfología general	59
4.1.2. Resultados en individuos impregnados	61
4.1.3. Resultados en inmunofluorescencia indirecta	64
4.1.3.1. Redes microtubulares	64
4.1.3.2. Ciliación e infraciliación	64
4.1.3.3. Otros sistemas citoesqueléticos	77 78
4.1.4. Ultraestructura celular	
4.1.4.1. Ultraestructura cortical	78



4.1.4.2. Infraciliación somática	78
4.1.4.3. Ultraestructura oral	83
4.1.4.4. Orgánulos citoplasmáticos	85
4.2. Morfogénesis de división	87
4.2.1. Comportamiento de las redes microtubulares durante la morfogénesis	97
4.3. Análisis cladístico	100
4.4. Quiste de resistencia	103
4.4.1. Cambios morfológicos	103
4.4.2. Estructura y formación de la pared	104
4.4.3. Biogénesis de las paredes quísticas	106
4.4.4. Cambios corticales	106
4.4.5. Cambios citoplasmáticos	106
4.4.6. Cambios nucleares	106
4.5. Análisis moleculares	108
4.5.1. Secuenciación parcial del ARNr 28 S	108
4.5.2. Árboles filogenéticos para el ARNr 28S.	111
4.5.3. Secuenciación parcial del gen $\alpha$ -tubulina	115
4.5.4. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la $\alpha$ -tubulina de <i>P. metchnikoffi</i> con la de otros ciliados	117
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	125
5.1. Ultraestructura y filogenia	128
5.1.1. Superficie celular o córtex	128
5.1.2. Elementos citoesqueléticos microtubulares	129
5.1.4. Infraciliación oral	133
5.1.5. Aparato nuclear	135



5.2. Morfogénesis y filogenia	137
5.2.1. Dinámica del citoesqueleto durante la morfogénesis	139
5.3. Criptobiosis y filogenia	141
5.4. Secuenciación y filogenia	143
5.4.1. Comparación de los resultados filogenéticos obtenidos de las secuencias de ARNr	143
5.4.2. Comparación de los resultados de la secuenciación de $\alpha$ -tubulina	148
5.4.3. Posible filogenia consenso para los grupos basales de espirotricos	150
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	151
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	155

# I. INTRODUCCIÓN

---



## 1.1. IMPORTANCIA DE LA SISTEMÁTICA EN LA INVESTIGACIÓN SOBRE CILIADOS: LA NECESIDAD DE ENFOQUES COMPLEMENTARIOS

Los ciliados forman un grupo diverso y muy diferenciado de microorganismos eucariotas. Este grupo comprende alrededor de 7.000 especies, que presentan una compleja sistemática, basada tradicionalmente en estudios morfológicos y morfogenéticos.

En relación a su estudio, podemos plantear dos cuestiones:

### **La primera de ellas es: ¿qué importancia tiene la investigación en ciliados?**

La investigación sobre los ciliados podría justificarse por tres razones fundamentales:

a) Se trata de un grupo de microorganismos cuya importancia ecológica es indiscutible: como componentes de comunidades biológicas, se desarrollan en variados tipos de hábitats y, además, son importantes tanto por su participación en las cadenas tróficas, como por su interacción con los elementos abióticos de los ecosistemas, en cuyos ciclos biogeoquímicos actúan de forma dinámica.

b) La utilización de un organismo eucariota unicelular supone evidentes ventajas experimentales, como la elevada tasa de reproducción en condiciones controladas de laboratorio, su fácil manipulación y la presencia de fenómenos sexuales que determinan recombinación genética y renovación de líneas celulares (Orias, 1981).

c) Se ha demostrado, por otro lado, su utilidad como modelos en la biología celular y molecular, dadas la complejidad de su citoesqueleto y su especial dualidad nuclear, entre otras características.

Para una extensa información sobre el significado e importancia de los protistas y, en particular, de los ciliados en la biología actual, remitimos al lector al artículo “Why the World Needs Protist!” (Corliss, 2004).

### **La segunda cuestión sería: ¿por qué se deben hacer estudios sistemáticos?**

La sistemática, tal como la definió Simpson (1961), es “el estudio científico de las clases y diversidad de organismos y de cualquier relación entre ellos”. De hecho, los sistemáticos la consideran como una disciplina central, sin la cual ninguna otra podría realizarse. Ciertamente, no se podría describir y hablar con rigor sobre el organismo con el que se está trabajando sin una formación sólida en esta área. La biología comparada desempeña un papel de primer orden en la investigación sistemática, cuyo enfoque es muy útil para generar hipótesis sobre la estructura y función de los organismos que puedan ser comprobadas experimentalmente. Por último, el criterio evolutivo es un aporte indispensable para abordar el trabajo sistemático y comprender los sistemas biológicos. Hoy sabemos que, cuanto mejor conozcamos los diferentes tipos de biodiversidad, más sabremos sobre el equilibrio de nuestros ecosistemas, de forma que así podremos conservarlos, explotarlos e incluso restaurarlos.



En relación con esta dinámica del conocimiento entre lo “pequeño” (microorganismos) y lo “grande” (sistemática), parece oportuno traer a colación los consejos que daba, según nos recuerda Lynn (1996), un eminente profesor a sus alumnos de biología acerca de los tres tipos de pensamientos que deberían integrar en su carrera: “(1) think “small”, organismically; (2) think “big” conceptually; (3) think “new” technologically”.

Los que nos dedicamos a la protistología ya tenemos experiencia en el primer tipo de pensamiento, si bien son menos los que intentan la necesaria visión global. Actualmente, las nuevas tecnologías nos permiten, en muchos casos, reestructurar cuando menos nuestra visión de la realidad, contestar a viejas cuestiones sin resolver, formular nuevos interrogantes y, en definitiva, nos inducen a pensar conceptualmente de forma más amplia.

A lo largo del trabajo de investigación de esta tesis, se ha intentado seguir el desarrollo de este planteamiento, sirviéndose para ello de los tres enfoques recién mencionados, con sus técnicas correspondientes, de una forma conjunta y no unilateral, lo que nos ha permitido llegar a los resultados que aquí se presentan, así como a discutir la congruencia o discrepancia entre ellos a través de la interrelación de distintos niveles metodológicos y de conocimiento.

## 1.2. PRINCIPALES HITOS EN LA SISTEMÁTICA DE LOS CILIADOS

Antes de analizar los resultados obtenidos en el grupo de ciliados sobre el que se ha centrado nuestro trabajo, vamos a hacer un breve recorrido histórico por las propuestas más importantes en la sistemática de los ciliados, condicionadas –como no podía ser de otro modo- por la tecnología del momento, para así entender las clasificaciones que se diseñaron y la trascendencia de ese conocimiento en los estudios posteriores.

### 1.2.1. Microscopía óptica

El primer trabajo de relevancia publicado sobre protozoos fue realizado por Bütschli entre 1887 y 1889. Este trabajo marcó la **Era del Descubrimiento (1880-1930)**, en la que los ciliados se estudiaron utilizando microscopios ópticos y fueron clasificados por las características de la ciliación somática y oral. Las técnicas citológicas para la observación y tinción de los ciliados fueron un factor que condicionaba la descripción precisa de la morfología.

La innovación de las técnicas de plata de Klein (1926), Chatton y Lwoff (1930) y Gelei y Horváth (1931) constituyeron los mayores avances técnicos que caracterizaron la **Era de la Expansión (1924-1950)**. Kahl (1930-1935) fue el autor que describió la mayoría de las 3.000 especies conocidas entonces.

Durante el tercer periodo, la **Era de la Infraciliación (1950-1963)**, el enfoque clásico combinado con el estudio de la morfogénesis de división, principalmente la estomatogénesis, realizado en su mayoría por autores franceses como Fauré-Fremiet (1950) y sus colaboradores, construyó la base de datos sobre la que se estableció el sistema de clasificación de los años 60. Así se formalizó, por ejemplo, la base de la



sistemática del grupo de los ciliados (Corliss, 1961) (fig. 1), que ha permanecido vigente durante casi 30 años y que es la siguiente:

### Subphylum Ciliophora

#### Clase Ciliata

Subclase	I. Holotricha	Subclase	II. Spirotricha
	Orden 1. Gymnostomatida		Orden 1. Heterotrichida
	Orden 2. Trichostomatida		Orden 2. Oligotrichida
	Orden 3. Chonotrichida		Orden 3. Tintinnida
	Orden 4. Suctorida		Orden 4. Entodiniomorphida
	Orden 5. Apostomatida		Orden 5. Odontostomatida
	Orden 6. Astomatida		Orden 6. Hypotrichida
	Orden 7. Hymenostomatida		
	Orden 8. Thigmotrichida		
	Orden 9. Peritrichida		

**Fig. 1.** En esta clasificación de Corliss (1961), los ciliados son un subfilo con una clase y dos subclases.

La anterior clasificación se basaba en la mayor o menor complejidad de la ciliación bucal con dos grandes supuestos:

-Que los holotricos, con una ciliación oral o circumoral simple, eran los representantes del tronco ancestral evolutivo.

-Que las especies con un aparato oral complejo de tipo espirotrico se originaron a partir de formas intermedias con aparatos orales de tipo himenostomido.

En ese mismo año, el francés Fauré-Fremiet (1961) propuso la división del orden Hypotrichida en dos subórdenes:

a) Stichotrichina, con ciliación somática ventral homogénea con hileras de cirros regularmente distribuidos (serían los hipotricos más “primitivos”, reminiscencia de los heterotricos).

b) Sporadotrichina, con ciliación ventral distribuida topográficamente en la célula con cirros frontales, ventrales, transversos, caudales y marginales (son los hipotricos “evolucionados”).

Las técnicas de microscopía óptica, que constituían el soporte de las clasificaciones de la época, con un profuso trabajo de medición y observación de caracteres, partían, sin embargo, de dos premisas erróneas: por una parte, lo que más se parecía era, en opinión de los fenetistas, lo más próximo y, por otra parte, se pensaba que las estructuras habían evolucionado desde las más sencillas a las más complejas.





### 1.2.2. Microscopía electrónica

La microscopía electrónica supuso un enfoque revolucionario al poner de manifiesto el elevado nivel de complejidad intracelular y, en consecuencia, demostrar los patrones de organización subcelular de los ciliados.

Aunque sólo una pequeña parte de las 8.000 especies descritas había sido analizada utilizando el microscopio electrónico, el impacto era sustancial, lo que determinó el comienzo de un cuarto gran periodo: la **Era de la Ultraestructura (1963-1985)**. En esta época, de nuevo los grupos francés y americano -Puytorac *et al.* (1974) y Corliss (1979)- presentaron, teniendo en cuenta la creciente información ultraestructural, un nuevo esquema taxonómico de los ciliados (fig. 2), claramente basado en el utilizado por Jankowski (1967). En éste los grupos aparecían con la categoría de clase: los Kinetofragminophora, los Oligohymenophora y los Polyhymenophora.

Los ciliados eran, por primera vez, reconocidos como un filo independiente, aunque la división en tres clases y el mismo nombre de los distintos taxones obedecían todavía a los caracteres del aparato oral, que se citan a continuación según el aumento de complejidad del área bucal:

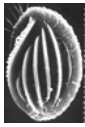
- a) Los Kinetophragminophora, con un área citostómica apical o subapical y una infraciliación oral poco diferenciada.
- b) Los Oligohymenophora, con una cavidad bucal bien definida, con una membrana paroral (esticodiada) a la derecha y tres orgánulos adorales, membranelas, a la izquierda.
- c) Los Polyhymenophora, con un gran desarrollo de la ciliación peristomial, con la presencia de una zona adoral de membranelas y una ciliación paroral que presenta una o más filas de cinetosomas.

Sin embargo, el aumento en el número de subclases (7) y órdenes (23) fue muy significativo, debido, fundamentalmente, a la introducción de nuevos criterios basados en la ingente cantidad de datos proporcionados por la información ultraestructural y la morfogénesis de división.

Con respecto a los hipotricos, un exhaustivo estudio de 310 géneros fue realizado por Borrer en 1972, que los clasificó en seis familias, si bien no reconoció los subórdenes propuestos por Fauré-Fremiet (1961).

Las propuestas sistemáticas enfrentadas de los grupos francés y americano se sucedieron durante esta década. Aunque con diferencias en los taxones inferiores, se mantuvieron, sin embargo, las tres grandes clases en significativas publicaciones:

-La de Puytorac y Grain (1976), que realizaron una revisión de la estructura de los organelos bucales que reforzaba la existencia de las tres clases.



-Las de Corliss (1974, 1979), que, en sus extensos tratados monográficos sobre ciliados, realzó el significativo patrón de los cinetosomas y las fibras a él asociadas. Sin embargo, a pesar de las evidentes características ultraestructurales somáticas, Corliss mantuvo la diferenciación de las tres clases definidas por el córtex oral (fig. 2).

-La del Comité de Sistemática y Evolución de la Sociedad de Protistólogos, que mantuvo las tres clases mencionadas (Levine *et al.*, 1980).

## Phylum Ciliophora

### Clase I. Kinetofragminophora

- Subclase (1) Gymnostomata
  - Orden 1. Primociliatida
  - Orden 2. Karyorelictida
  - Orden 3. Prostomatida
  - Orden 4. Haptorida
  - Orden 5. Pleurostomatida
- Subclase (2) Vestibulifera
  - Orden 1. Trichostomatida
  - Orden 2. Entodiniomorphida
  - Orden 3. Colpodida
- Subclase (3) Hypostomata
  - Orden 1. Synhymeniida
  - Orden 2. Nassulida
  - Orden 3. Cyrtophorida
  - Orden 4. Chonotrichida
  - Orden 5. Rhynchodida
  - Orden 6. Apostomatida
- Subclase (4) Suctoria
  - Orden 1. Suctorida

### Clase II. Oligohymenophora

- Subclase (1) Hymenostomata
  - Orden 1. Hymenostomatida
  - Orden 2. Scuticociliatida
  - Orden 3. Astomatida
- Subclase (2) Peritricha
  - Orden 1. Peritrichida

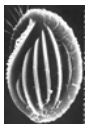
### Clase III. Polyhymenophora

- Subclase (1) Spirotricha
  - Orden 1. Heterotrichida
  - Orden 2. Odontostomatida
  - Orden 3. Oligotrichida
  - Orden 4. Hypotrichida

**Fig. 2.** Clasificación del Phylum Ciliophora (Doflein, 1901), según Corliss en 1979.

Una publicación de Ehret's en "Science" en 1960 le proporcionó a Lynn (1976, 1981) la base conceptual para dar un sentido filogenético al amplio banco de datos ultraestructurales. Si, como este autor argumentaba, la organización biológica estaba organizada jerárquicamente a partir de un conjunto de elementos agrupados para formar el siguiente nivel superior de complejidad, debía de existir alguna "dirección", en la escala de variación de las estructuras de los niveles inferiores, para que en los niveles superiores las estructuras se pudieran organizar correctamente.

Lynn (1976) formuló entonces, con respecto a la evolución en ciliados, la "hipótesis del conservadurismo estructural": "la conservación de las estructuras a lo largo del tiempo es inversamente proporcional a su nivel de organización biológica". Años más tarde (Lynn, 1979) propuso dos importantes razones para considerar que las estructuras somáticas están evolutivamente más conservadas que las orales y que, por tanto, son más fiables para la filogenia:



a) Por un lado, la aparición de las nuevas cinétidas somáticas es muy dependiente de la presencia de las cinetidas preexistentes y, por tanto, su relación puede dar lugar a limitaciones muy fuertes en la variabilidad de sus componentes.

Posteriormente, Lynn y Small (1981, 1985), al revisar el estado plesiomórfico de la dicinétida en el córtex somático, concluyeron que la organización cortical más estable desde el punto de vista evolutivo es el par de cinetosomas.

b) Por otro lado, el desarrollo de la región oral no se origina a menudo a partir de la región oral preexistente, además de estar constituida por múltiples estructuras cada una de las cuales es capaz de sufrir una variación, por lo que una modificación global en las estructuras orales es más probable. Los cambios en la organización de las estructuras orales pueden conducir a una mayor eficacia en la captura y en la ingestión del alimento y, por tanto, a un aumento de la tasa de crecimiento de la biomasa que favorece esta variabilidad en los nuevos individuos.

Por esa misma época, Small (1976) propuso la división del filo de los ciliados en dos subfilos: los Rhabdophora y los Cyrtophora. Los primeros son ciliados con un gran desarrollo de los microtúbulos transversos en las cinetias periorales. Los segundos presentan pares de cinetosomas con microtúbulos postciliares que se reúnen en haces en esa ciliación perioral. Esta terminología fue utilizada posteriormente en la primera clasificación en la que se tuvieron en cuenta datos ultraestructurales, aunque estos fueran de la infraciliación oral. Sin embargo, en un estudio filogenético cladístico posterior basado en datos ontogenéticos (Foissner, 1996), se demostró que el tipo rhabdos, con retención de las estructuras orales en la estomatogénesis, es un carácter apomórfico presente sólo en los litostomados.

Entre los interesantes cambios taxonómicos que se produjeron en aquel momento, está el del género *Bursaria*, considerado dentro de los heterotricos por Corliss (1961 y 1979). Su cinetida somática, sin embargo, no era similar a la de los heterotricos, sino esencialmente de tipo colpodido, y así se demostró en un trabajo de Fernández-Galiano (1979). Las estructuras orales empezaron a dejar de ser fiables como indicadores de un ancestro común y, por tanto, los esquemas filogenéticos de clasificación propuestos por Puytorac *et al.* (1974), Puytorac y Grain (1976) y Corliss (1979) empezaron a tambalearse.

Al mismo tiempo, Gerassimova y Seravin (1976) propusieron que el sistema fibrilar ectoplasmático (somático) de los ciliados era fundamental para entender su filogenia.

Basándose entonces en la mayor estabilidad en la estructura de las cinetidas somáticas, Small y Lynn (1981, 1985) presentaron una nueva clasificación del Phylum Ciliophora (fig. 3) que por fin incluía 3 subfilos -Rhabdophora, Cyrtophora y el nuevo subfilo Postciliodesmatophora (éste último así denominado por la presencia de largos haces de microtúbulos postciliares asociados a las cinetias somáticas)- y 8 clases, constituidas según el patrón estructural de sus cinétidas somáticas, a las que poco después se les añadiría la clase Heterotrichea, como se explicará más adelante. No obstante, los órdenes se siguieron estableciendo de acuerdo con los criterios citológicos clásicos de morfología y morfogénesis de división.



## Phylum Ciliophora

### Subphylum (I) Postciliodesmatophora

#### Clase I. Karyorelictea Clase II. Spirotrichea

Subclase (1) Heterotrichia  
Orden 1. Heterotrichida  
Orden 5. Phacodiniida  
Subclase (3) Stichotrichia  
Orden 1. Stichotrichida

### Subphylum (III) Cyrtophora

#### Clase I. Phyllopharyngea Clase II. Nassophorea

Subclase (2) Hypotrichia  
Orden Euplotida

#### Clase III. Oligohymenophorea Clase IV. Colpodea

### Subphylum (II) Rhabdophora

#### Clase I. Prostomatida Clase II. Litostomatea

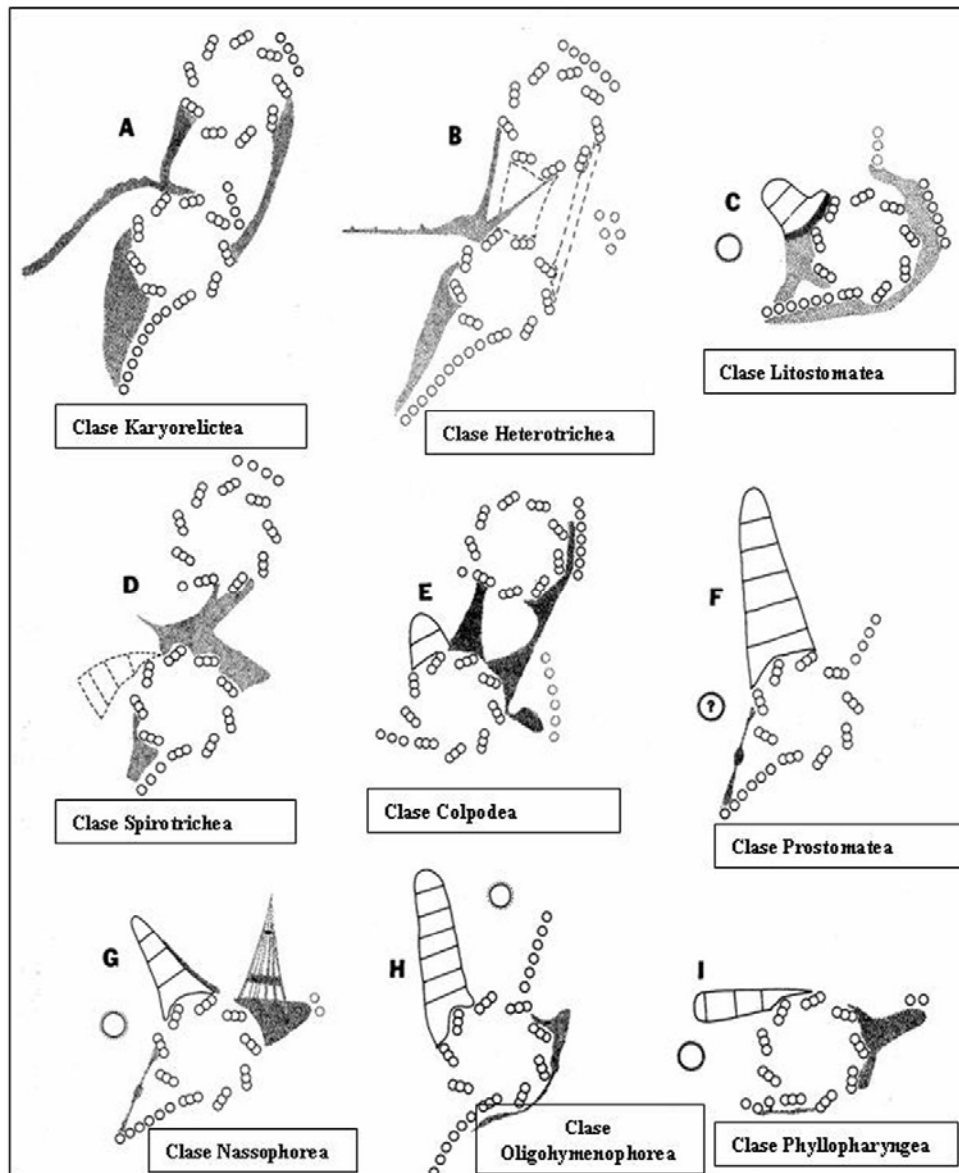
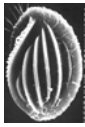
**Fig. 3.** En el esquema se incluyen los subfilos y clases propuestos por Small y Lynn (1985), así como las subclases y órdenes de la clase Spirotrichea relevantes para el presente trabajo.

Se trata de una clasificación “novedosa” con importantes cambios con respecto a las precedentes, como son los siguientes:

-La proximidad filogenética de los kariorelictidos y los espirotricos que aparecen incluidos en el mismo subfilo.

-La segregación de los espirotricos, sobre todo en lo que respecta a los euplotidos, que ahora aparecen en otro subfilo y dentro de la clase Nasophorea: se resalta así el córtex somático primitivo de los espirotricos, clásicamente considerado como muy evolucionado por las características de su organización oral.

En 1985, en su obra *Illustrated Guide to the Protozoa*, Small y Lynn redistribuyeron gran cantidad de géneros a los que o bien se les había clasificado antes como problemáticos -“incertis sedis”-, o bien sí se les había atribuido ya una posición tradicional, pero que entonces se descubrió errónea gracias a la ingente cantidad de estudios sobre el córtex somático realizados al microscopio electrónico. La figura 4 reproduce las clases reconocidas de acuerdo al patrón ultraestructural de las cinéticas que incluye a las clases consideradas en la figura 3 más la clase Heterotrichea.



**Fig. 4.** Representación de la estructura de las cinétidas somáticas de las principales clases de ciliados reconocidas por Small y Lynn a finales de los años 80.

Simultáneamente, dos grupos franceses (Fleury *et al.*, 1986; Tuffrau, 1987) intentaban reorganizar la clasificación de los hipotricos “clásicos” gracias a los estudios morfogénéticos, para así redefinir el orden, con mayor variabilidad, sobre todo, en las ramas más basales.

La investigación desarrollada por el grupo de Fleury les llevó a establecer dos nuevos grupos:

- a) Los euhypotricos, con cirros que siempre presentan el mismo patrón ultraestructural. La infraciliación paroral es siempre doble (paroral y endoral) y también existe una homogeneidad en el patrón morfogénético en el que se reconstruye toda la infraciliación somática “de novo”. Ejemplos serían *Parastrongylidium* y *Kahliella*.



b) Los pseudohipotricos, con cirros con disposición ultraestructural variable. El aparato paroral es simple o doble y sólo una parte de la ciliación somática se origina “de novo” durante la estomatogénesis. Ejemplos serían *Euplotes*, *Certesia*, *Diophrys*, *Kiitricha* o *Uronychia*.

De esta forma, los clásicos estichotrichina y esporadotrichina de Fauré-Fremiet (1961) quedarían incluidos en los euhypotricos, mientras que los euplotidos se denominarían, a partir de ese momento, pseudohipotricos.

Pero el grupo de Tuffrau (1987), discípulo de Fauré-Fremiet, se manifestó en desacuerdo con la clasificación de Fleury *et al.* (1986) y mantuvo las categorías taxonómicas de su maestro, si bien con la segregación de los euplotidos. Así, consideró cuatro subórdenes principales para el orden de los hipotricos:

- Subord. Euplotina
- Subord. Discocephalina
- Subord. Stichotrichina
- Subord. Sporadotrichina.

Por último, en ese mismo año 1987, un tercer grupo francés, el de Clermont-Ferrand, liderado por de Puytorac, mantuvo, en su monografía “Precis de Protistologie” (1987), la posición más conservadora de todas las de la época, ya que dividió el filo de los ciliados en cuatro subfilos, tres de ellos taxones, cuya etimología corresponde a características de la infraciliación bucal:

- |                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|
| -Subfilo Prostomata      | -Subfilo Polyhymenophora |
| Clase Prostomatea        | Clase Heterotrichea      |
| Clase Vestibuliferea     | Clase Spirotrichea       |
| Clase Colpodea           | Subclase Hypotrichia     |
|                          | Subclase Oligotrichia    |
| -Subfilo Karyorelicta    | -Subfilo Hypostomata     |
| Clase Trachelocercea     | Clase Phyllopharyngea    |
| Clase Loxodea            | Clase Nassophorea        |
| Clase Protoheterotrichea | Clase Oligohymenophorea  |
| Clase Protocruziidea     |                          |

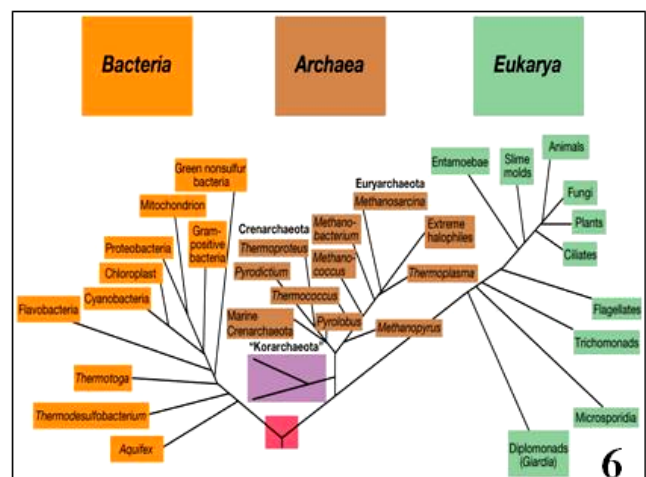
Como se observa, los autores situaron a los heterotricos de nuevo junto a los hipotricos, dentro del subfilo Polyhymenophora. Sin embargo, se admiten las nueve clases propuestas por Small y Lynn (1981, 1985) a las que se suman tres clases más, originadas al elevar los kariorelictidos a la categoría de subfilo y, en consecuencia, pasar los órdenes dentro de este grupo a la categoría de clase.

Los interrogantes que se presentaban ahora en el horizonte implicaban otras cuestiones; por ejemplo, si los tres o cuatro subfilos eran realmente monofiléticos, cómo fueron las relaciones en su origen y cuáles eran las relaciones entre las clases. Sin embargo, estas cuestiones no podían responderse exclusivamente con los estudios ultraestructurales.



### 1.2.3. Estudios moleculares

Uno de los más grandes impactos en el estudio filogenético molecular se debió a Woese (1994): los clásicos 5 reinos de organismos (Monera, Protistas, Hongos, Plantas y Animales) o los dos superreinos (Procariotas y Eucariotas), tan ampliamente difundidos y utilizados para agrupar la diversidad de los seres vivos, se venían abajo con la utilización de la secuencia de ARN ribosómico. Según estos resultados, la vida en la Tierra ha evolucionado, a partir de un ancestro común, siguiendo sólo tres grandes linajes, dos de los cuales -Bacteria y Archaea- son exclusivamente microbianos y están compuestos solamente por células procarióticas, mientras que el tercero -Eukarya- constituye la línea eucariótica. Las figuras 5 y 6 muestran las diferencias entre la primera propuesta filogenética en la que aparecen los protistas (Haeckel, 1866) y la propuesta de Woese *et al.* (1994).

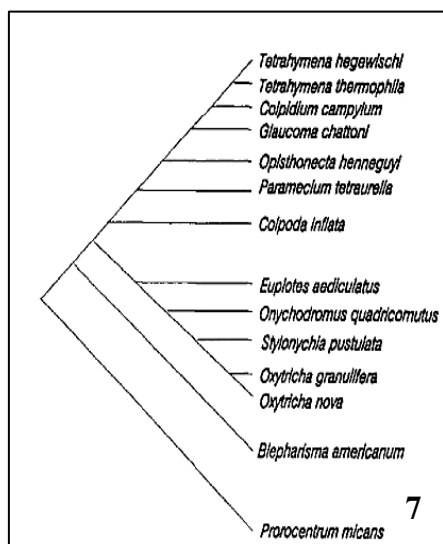


**-Fig. 6.** Árbol filogenético universal de Woese (1994) determinado por comparación de las secuencias de ARN ribosómico en el que, dentro de cada dominio, sólo se muestran algunos organismos clave de cada linaje.

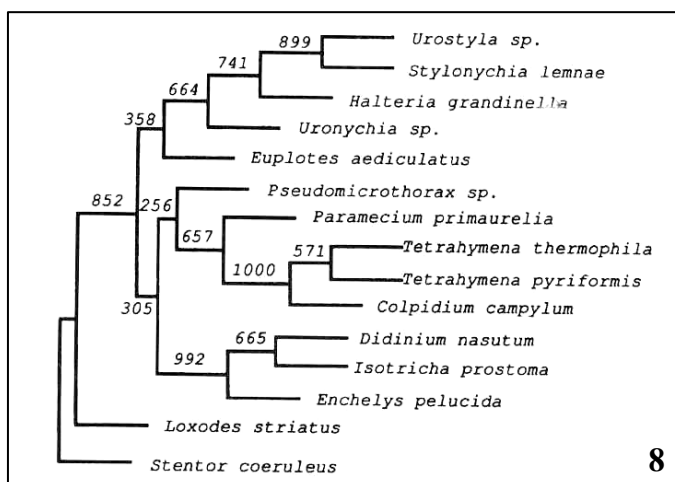


Los datos obtenidos en los estudios moleculares han modificado profundamente la estructura del árbol evolutivo de los eucariotas y, en particular, la parte basal donde los protistas se diversifican. Además, las distancias evolutivas entre los grupos de protistas parecen ser mucho mayores que las esperadas y la mayoría de ellos se ramifican en una radiación explosiva que precede a la aparición de los organismos multicelulares (Cavalier-Smith, 1993; Schlegel, 1994; Sogin, 1994; Adoutte, 1996). El estudio de esta radiación se presenta como una gran revolución con respecto a las ideas previas y supone un cambio en la concepción de la filogenia de los seres vivos que será la base de un importante debate en los años posteriores.

La rentabilidad del desarrollo de técnicas rápidas que fácilmente secuenciaran grandes fragmentos de ARNr 18S y 28S fue puesta de manifiesto por Qu *et al.* (1983), a los que siguieron otros investigadores en la consideración de que estas moléculas eran excelentes indicadores filogenéticos. Además de contener una gran cantidad de información, presentaban una estructura en mosaico específica, con una serie de dominios con tasas evolutivas muy distintas. Así, las secuencias que han evolucionado más rápidamente pueden utilizarse para comparar especies que se espera sean más próximas, mientras que las regiones que han evolucionado más lentamente pueden emplearse para aquellas especies más distantes.



**Fig. 7.** Árbol filogenético de Lynn y Sogin (1988) con la secuencia parcial del ARNr 18S de varios ciliados. Las distancias de las ramas no son significativas filogenéticamente.



**Fig. 8.** Árbol filogenético de Baroin *et al.* (1992) con la secuencia parcial del ARNr 28S de varios ciliados realizado mediante análisis "bootstrap".

En el caso de los ciliados, la gran mayoría de los estudios filogenéticos moleculares se han basado en la comparación de secuencias de ARNr. Muchos de los realizados en las últimas décadas han sido realizados con ARN 18S (Lynn y Sogin, 1988: fig. 7; Greenwood *et al.*, 1991a; Greenwood *et al.*, 1991b; Leipe *et al.*, 1994; Bernhard *et al.*, 1995; Hirt *et al.*, 1995; Hammerschmidt *et al.*, 1996), mientras que el grupo francés ha utilizado la subunidad grande ARN 28S (Baroin *et al.*, 1992: fig. 8). En ambos casos los resultados son congruentes con relevantes datos obtenidos ya en los estudios morfológicos y morfogenéticos:





-Los ciliados forman también un grupo monofilético en los árboles de ARN ribosómico.

-Los ciliados muestran un patrón de diversificación consistente, con una serie de importantes y significativas ramas que se corresponden con la mayoría de las clases definidas morfológicamente (Lynn y Sogin, 1988; Greenwood *et al.*, 1991; Baroin *et al.*, 1992; Bernhard *et al.*, 1995; Hirt *et al.*, 1995; Hammerschmidt *et al.*, 1996). Estas clases se corresponden con las definidas por Small y Lynn (1981, 1985) y confirman la relación entre los datos moleculares y el criterio de que las cinétidas somáticas son mejores indicadores de un ancestro común que los rasgos orales.

¿Cómo son estas relaciones en la actualidad y cuál pudo haber sido el aspecto principal que marcó su evolución?

En 1991, Lynn recapituló las descripciones sobre las cinétidas somáticas realizadas en los últimos años y así intentó completar la sistemática de los ciliados. Básicamente, el problema residía en que varios patrones de cinetidas no encajaban en ninguno de los descritos para las nueve clases propuestas (Small y Lynn, 1985); entre ellos, los de *Phacodinium*, *Transitella*, *Plagiopyla*, *Lechriopyla*, *Mesodinium* y *Schizocaryum*.

Simultáneamente, el grupo de André Adoutte en Orsay, Paris, intentaba dar una respuesta consensuada a estas cuestiones a través de dos vías: por un lado, con el análisis molecular de aquellas especies en posiciones inciertas; por otro, con el análisis de los datos inmunocitoquímicos y ultraestructurales del citoesqueleto en las células vegetativas y durante los procesos morfogénéticos (Fleury *et al.*, 1992, 1993 y 1994; Iftode *et al.*, 1997). En el II congreso europeo de ciliados, celebrado en Clermont-Ferrand (Fleury *et al.*, 1995), dicho grupo presentó una comunicación en la que planteó la siguiente reflexión:

*“Uno de los caracteres específicos de los ciliados, además de dar nombre al grupo, son los miles de cilios anclados en el córtex, con un patrón específico según las especies. Asociadas a este carácter morfológico, existen algunas especializaciones adaptativas, como un aumento de velocidad en el desplazamiento o de diversificación en la capacidad de capturar presas. Potenciar dicha capacidad se ha logrado en el curso de la evolución diversificando las formas celulares y los patrones ciliares en asociación con adaptaciones ecológicas. Al mismo tiempo, se solucionaron varios problemas, tales como sincronizar el batido ciliar para un desplazamiento eficaz o reproducir el patrón ciliar a través de la reproducción sexual o asexual. Debido a que el patrón y el modo de implantación ciliar es una cuestión de organización del córtex celular, está claro que la evolución de la morfología de los ciliados es predominantemente un hecho basado en la evolución de su córtex.*

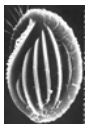
*En este citoesqueleto especializado, todas las especies presentan uno de los tres tipos de sistemas microtubulares asociados con los cuerpos basales. Todos los ciliados presentan este sistema, el cual conduce a una polarización del cuerpo basal, por lo que se asume que este sistema es ancestral y puede haber sido un punto clave en la emergencia y diversificación de los ciliados”.*



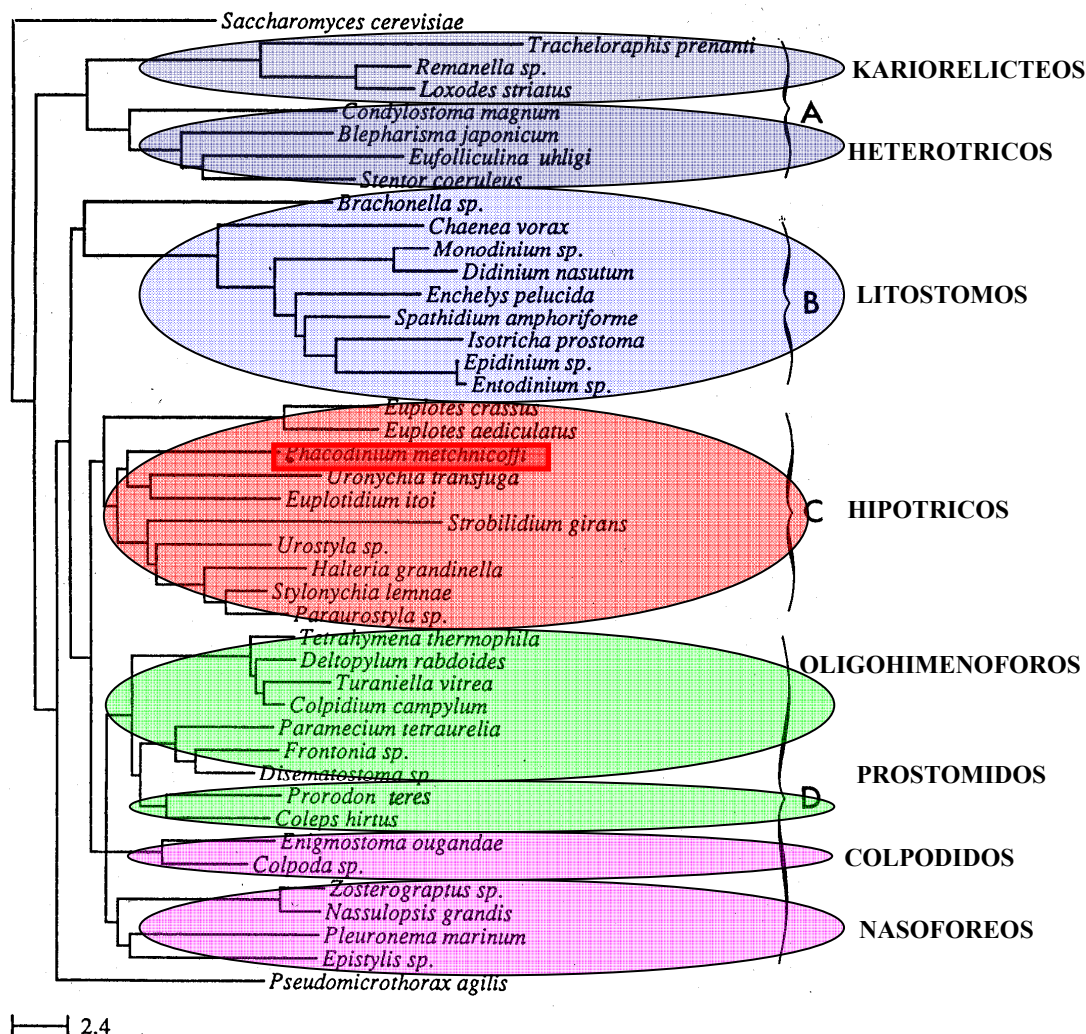
Si el anterior postulado clave, después de los análisis bioquímicos, inmunocitoquímicos y ultraestructurales, se intentaba integrar con los resultados extraídos de los árboles de ARN ribosómico 18S y 28S, aparecían, en una temprana constitución, a pesar de la rápida radiación explosiva del filo de los ciliados, cuatro subgrupos que se corresponden con distintas organizaciones del citoesqueleto, cada una de las cuales se caracteriza por la hipertrofia de uno de los elementos citoesqueléticos que sustenta el córtex (fig. 9).

Los cuatro subgrupos son los siguientes:

- Subgrupo A. Se corresponde con “el sistema postciliodésmico”, que se basa en el desarrollo cortical de microtúbulos postciliares, los cuales proceden del cuerpo basal posterior de cada dicinetida. Los cuerpos basales de las cinetias se anclan al córtex gracias al gran desarrollo de los microtúbulos postciliares que se reúnen y forman haces longitudinales que refuerzan la superficie cortical. Durante la división, los nuevos cuerpos basales aparecen próximos a los parentales, en una localización que está determinada por la polarización del cuerpo basal. Las nuevas fibras postciliares polimerizan, probablemente, entre las parentales, actuando como una estructura-guía para el ensamblaje microtubular. Como consecuencia, los heterotricos, considerados durante mucho tiempo como espiotricos típicos (Bütschli, 1889; Kahl, 1932; Corliss, 1979), aparecen ahora como una clase separada dentro del subfilo Postciliodesmatophora. Además, en este subgrupo, el macronúcleo se divide mediante microtúbulos extramacronucleares (Lynn y Small, 1997).
- Subgrupo B. Se corresponde con “el sistema ectofibrilar”, en el que los cuerpos basales se disponen en una capa ecto-endoplásmica construida con proteínas de tipo centrina. Durante la división de la célula, los nuevos cuerpos basales también aparecen próximos a los parentales. La capa ecto-endoplásmica podría actuar en la disposición del conjunto de los nuevos cuerpos basales, como sugieren los estudios de regeneración (Golinska, 1992).
- Subgrupo C. Se corresponde con “el sistema microtubular libre”. Se trata de una organización con un profundo desarrollo de microtúbulos independientes de los cuerpos basales, dispuestos en forma de una red que se distribuye por todo el córtex, en los que quedan insertados los cuerpos basales. Durante la división se renuevan casi todos los cinetosomas y aparecen los nuevos cuerpos basales en relación con los parentales. Los microtúbulos de la superficie se originan probablemente a partir de estos conjuntos de nuevos cuerpos basales (Fleury, comunicación personal).
- Subgrupo D. Se corresponde con “la estrategia epiplásmica”, en la que frecuentemente se presentan interacciones entre los cuerpos basales y las fibras asociadas, por un lado, y el epiplasma en los procesos morfogenéticos, por otro. El patrón básico es la inserción de cuerpos basales dentro del epiplasma, reforzados por microtúbulos o fibras cinetodésmicas hiperdesarrolladas para asegurar la cohesión longitudinal de las cinetias. Durante la morfogénesis, los



nuevos cuerpos basales aparecen próximos a los parentales y luego se disponen en el epiplasma. El espaciamiento de los cinetosomas resulta entonces de un crecimiento anisotrópico del epiplasma (Iftode, 1989).



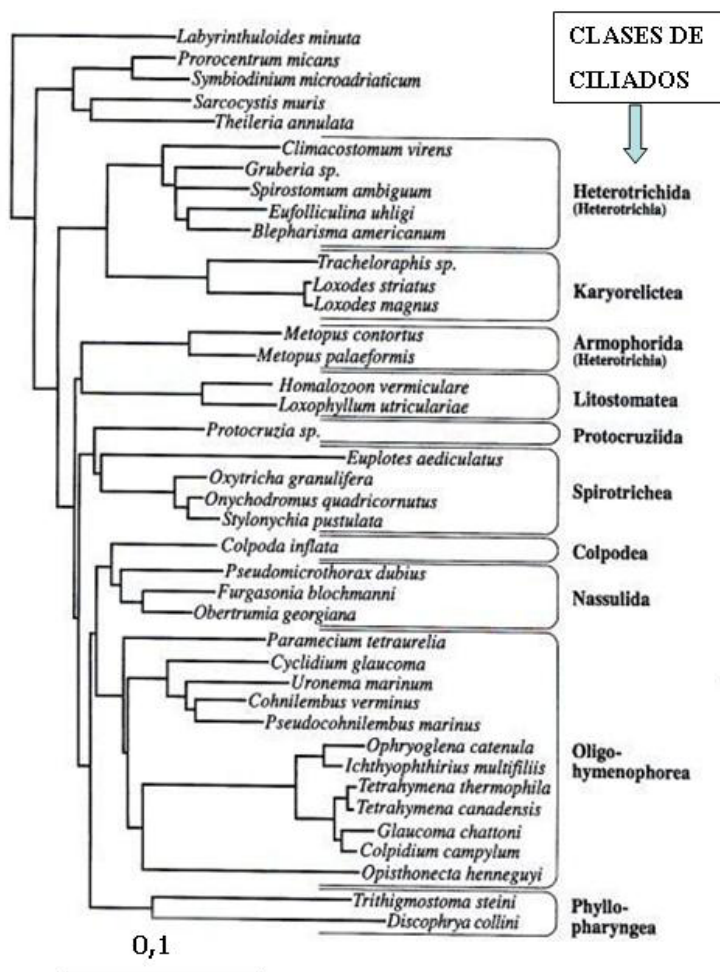
**Fig. 9.** El dendrograma reproduce el modelo propuesto por Fleury *et al.* (1992, 1995) en los grupos que aparecen como A, B y D. En el caso de los hipotricos, C, figuran los resultados filogenéticos, a partir de la secuenciación de *Phacodinium metchnikoffi*, que obtuvimos en colaboración en su laboratorio en Orsay (Paris).

Sin embargo, a pesar de que, en esta propuesta, la mayoría de las especies incluidas en cada uno de los subgrupos se corresponde con el modelo citoesquelético y ontogénico descrito, seguían existiendo algunos organismos que no respondían al patrón del grupo en el que el análisis molecular los situaba. Es más, estos organismos se correspondían con especies basales de los distintos grupos indicados, lo cual sugiere que reflejan un estadio evolutivo en el que la hipertrofia de uno u otro elemento todavía no se había logrado completamente.

Entre los estudios posteriores con el fin de resolver la posición de algunas especies, destaca el de Hammerschmidt *et al.* (1996) (fig. 10). Su objetivo era aclarar



cómo se puede haber producido la evolución hacia el dualismo nuclear. Para ello utilizaron ciliados kariorelictidos (*Loxodes* sp y *Protocruzia* sp) y heterotricos (*Climacostomum* y *Eufolliculina*) clasificados hasta ese momento como los más primitivos. Dado que el estudio de *Loxodes* y algunos heterotricos había sido realizado ya por Baroin *et al.* (1992) y que, por otro lado, Hirt *et al.* (1995) habían confirmado su relación como grupos hermanos en la base del árbol evolutivo de los ciliados, la importancia de la publicación de Hammerschmidt residió en la nueva posición de *Protocruzia*, que, hasta ese momento, se había considerado un kariorelictido: su conclusión fue que *Protocruzia* es una rama independiente, aunque cerca de la que origina la clase de los espirotricos.



**Fig. 10.** Filogenia de los ciliados según Hammerschmidt *et al.* (1996) después de la secuenciación de la subunidad 18S del ARNr. La barra de escala corresponde a 10 cambios cada 100 posiciones.

A partir de estos estudios, se destacan claramente dos aspectos importantes que cuestionaban la sistemática clásica de los ciliados:

-De nuevo, el orden simultáneo de aparición de las principales ramas, lo que sugiere que se han originado conjuntamente en una rápida diversificación del filo.

-La temprana línea de la que surgen los heterotricos y kariorelictidos, los cuales fueron considerados tradicionalmente entre las especies más evolucionadas.



Como consecuencia, Lynn (1996) postuló la segregación, en la evolución de los ciliados, de dos grandes grupos (subfilos):

-Subfilo Postciliodesmatophora (Small y Lynn, 1981, 1985): es un subfilo nombrado ya anteriormente, pero del que ahora se excluyen los hipotricos “sensu lato”. Se trata de un subfilo caracterizado por dicinetidas somáticas con un gran desarrollo de los haces microtubulares postciliares y a menudo, aunque menos desarrolladas y dirigidas lateralmente, fibras cinetodesmales. En relación a la evolución del macronúcleo, los heterotricos, con microtúbulos extramacronucleares para la división del macronúcleo, son un grupo hermano de los kariorelicteos y no sus descendientes. Por tanto, los autores concluyen que la división macronuclear en la que están implicados microtúbulos intramacronucleares es ancestral y al menos habría ocurrido dos veces en la evolución de los ciliados, aunque se desconoce qué presión selectiva condicionó la presencia de los microtúbulos extramacronucleares en los heterotricos.

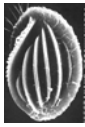
-Subfilo Intramacronucleata: se trata de un subfilo en el que el macronúcleo se divide mediante microtúbulos intramacronucleares. Incluye al resto de las clases, con grandes distancias filogenéticas entre ellas. Lynn (1996) considera, como ya había hecho Orias (1991), que esta línea se originó a partir de un ciliado ancestral con un macronúcleo incapaz de dividirse, que posteriormente derivó hacia formas en las que el macronúcleo se separaba gracias al desarrollo de microtúbulos intramacronucleares. La rápida radiación de este grupo debió de originarse, según Lynn, por alguna propiedad, aún sin determinar, de su organización celular ciliada. Por tanto, en estos momentos, no sabemos cómo una línea se transformó en la otra y cuáles son las relaciones más profundas entre las clases.

Cabe destacar que, en ese momento de auge de los análisis moleculares y de gran congruencia con los estudios del córtex somático, algunos investigadores todavía reivindicaban el papel evolutivo del córtex oral. Uno de los autores que consideraba una mayor relevancia filogenético del córtex oral con respecto al somático es Eisler (1992, 1995), que propuso la siguiente secuencia en la evolución del cinetosoma ciliar:

-A partir de un protista ancestral de tipo dinoflagelado, se produjo un cambio en la orientación del eje principal de la célula, de forma que los dos flagelos quedaron en disposición ecuatorial. El primer paso fue la formación, a partir del aparato flagelar, de la membrana paroral como una formación sencilla de diadas de cinetosomas. Su función pudo ser originariamente múltiple: locomotriz, nutricional y estructural en relación con la formación de un citoesqueleto citofaríngeo. En un segundo paso, a partir de la fila derecha de la diada se produjo una migración de cinetosomas para incorporarse al córtex somático (como ocurre durante la morfogénesis de muchos ciliados). En un tercer paso, las estructuras adorales habrían evolucionado a partir de cinétidas somáticas situadas a la izquierda del área oral.

-Por otro lado, el patrón de diada de la paroral, aunque desaparezca en los adultos, está presente durante la estomatogénesis de muchos ciliados.

-Como consecuencia de lo anterior, el tipo de estomatogénesis bucocinética sería la más primitiva y, por tanto, son más primitivos los ciliados que lo presentan, como es el caso del kariorelictido *Loxodes*.



Sin embargo, otros autores prestigiosos en el estudio de los ciliados confrontan estos estudios con otros del córtex oral.

Así, Foissner (1993) realizó uno de los estudios más ilustrativos a este respecto, en el que comparó numerosos géneros de la clase Colpodea con estos resultados: todos comparten el mismo patrón de cinétidas somáticas, mientras que se manifiesta una fuerte diversidad en las estructuras de la región oral. No obstante, Foissner (1996) sí realizó, posteriormente, la gran importancia filogenética de los estudios ontogenéticos, y coincidió con Eisler en considerar el tipo bucocinético como el más primitivo.

Otro autor que ha investigado profundamente las estructuras orales es Grain, que en 1995 realizó una revisión de la estomatogénesis de aquellos grupos que la biología molecular mostraba como basales en el árbol de los ciliados, y destacó estos aspectos:

-Que en *Loxodes*, con estomatogénesis bucocinética, la infraciliación somática no participa en la formación de las estructuras bucales.

-Que en los heterotricos, con estomatogénesis paracinética, sólo son unas pocas cinetidas somáticas las implicadas en la diferenciación del primordio oral (primero, de las membranelas, y después, de la paroral). Esta secuencia es la opuesta a la propuesta por Eisler y, por tanto, en los primeros ciliados emergentes, nunca la infraciliación oral origina la somática.

Sólo dos casos coinciden con la hipótesis de Eisler: en *Furgasonia* (clase Nasophorea), la paroral origina una cinetia somática en el protero; y en *Paraurostyla* (clase Spirotrichea), un único primordio origina, en su lado derecho, una estructura somática (el cirro frontal 1) y, en el resto, los dos orgánulos parorales. Sin embargo, Grain considera que en estos ciliados no es la estructura bucal la que origina una somática, sino que un único primordio de un área cortical desestabilizada origina dos tipos de estructuras ciliares, somática y bucal, según la localización de los cinetosomas, cuando el área se desestabiliza.

Con todo ello, Grain propuso el siguiente esquema de sucesos sobre el origen de las cinetias somáticas y la evolución desde el protociliado al verdadero ciliado:

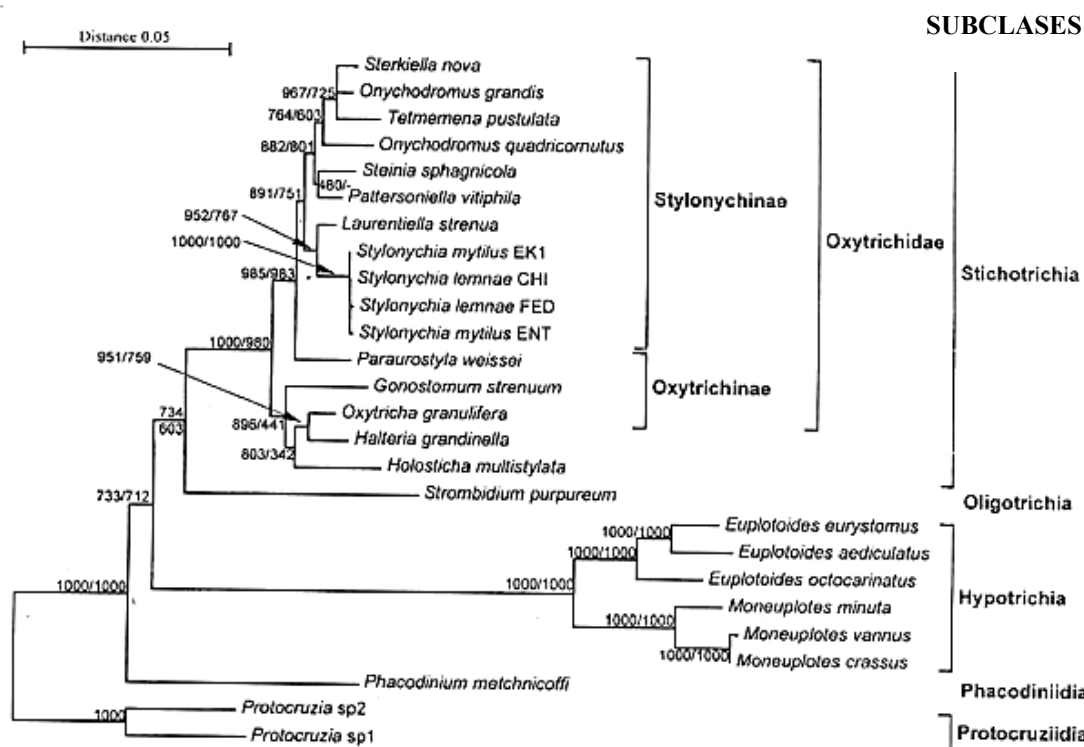
	Evolución del cinetosoma en los ciliados, según la hipótesis de Eisler (1992)	Estomatogénesis en los heterotricos Grain (1995)
1 <sup>er</sup> paso	1 dicinétida oral→Paroral	n cinetias somáticas→campo anárquico de cinetosomas
2 <sup>o</sup> paso	Paroral→Cinetias somáticas	Campo anárquico→membranelas
3 <sup>er</sup> paso	Cinetias somáticas→Membranelas	Campo anárquico→paroral
Conclusión	Bucal→Somático→Bucal (derecha) (izquierda)	Somático →Bucal (izquierda) →Bucal (derecha)



Los estudios filogenéticos se han continuado durante los últimos años de la década de los 90 y los primeros años del siglo XXI, en los que se han llevado a cabo numerosas investigaciones, basadas especialmente en la obtención de nuevos datos moleculares, con el objetivo de clarificar la posición taxonómica de varios grupos de ciliados. Especial interés despertó en los investigadores la Clase Spirotrichea, sobre todo después de haber quedado patente su nula relación con el grupo de los heterotricos. Con los datos entonces disponibles, Lynn (1996) y Lynn y Small (1997) incluyeron entonces en la clase Spirotrichea estas subclases: Stichotrichia, Hypotrichia, Choreotrichia y Oligotrichia.

A partir de los resultados obtenidos por Calvo (1989), Fernandez-Galiano y Calvo (1992) y Calvo *et al.* (1995, 2004) sobre la pertenencia de *Phacodinium metchnikoffi* al clado de los espirotricos, su exclusión de los heterotricos, y la relación filogenética de éste con *Protocruzia* (Hammerschmidt *et al.*, 1996), Shin *et al.* (2000) secuenciaron la subunidad pequeña de ARNr y determinaron que la posición de *Protocruzia* es siempre basal y de alguna forma representa al espirotrico ancestral, mientras que *Phacodinium* está sólidamente establecido en este clado y aparece en una línea independiente, por lo que se propone su inclusión en su propia subclase.

Un trabajo de Bernhard *et al.* (2001) (fig. 11), con la secuencia de cinco especies de euplotidos y ocho especies de oxytrichidos, completó en gran medida el estudio de Shin *et al.* (2000) sobre las relaciones en el grupo de los espirotricos, de lo que resultaron las siguientes subclases:



**Fig. 11.** Árbol de matriz de distancia inferido de las secuencias completas de ADNr 18S. La primera cifra en los nodos representa el valor real para el grupo. La segunda cifra representa el valor para el grupo después del análisis de 1.000 árboles con máxima parsimonia con PAUP\*4.0.





A este estudio le siguieron otros trabajos importantes por lo que supusieron, especialmente, en la resolución de la parte basal del árbol evolutivo de los espirotricos:

-El primero se debe a Lynn y Strüder-Kypke (2002), que analizan la posición de tres ciliados endosimbiontes de equinodermos clasificados, hasta ese momento, como heterotricos. De estos resultados, el más interesante para nuestro estudio es el obtenido sobre el género *Licnophora*, ya que, después de los análisis de máxima parsimonia, aparece siempre sólidamente establecido con los espirotricos, pero en una posición muy significativa entre las subclases basales de Protocruziidia y Phacodiniidia.

-El segundo es obra de Miao *et al.* (2007) (véase el capítulo V, “Discusión”). En ese estudio, la clase de los espirotricos aparece constituida por ocho subclases y la subclase Protocruziidia se sitúa en la base de los espirotricos, mientras que la subclase Phacodiniidia lo hace en la base de los hipotricos.

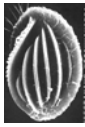
-El tercero es el trabajo de Kuidong *et al.* (2008), después del cual parece confirmarse que la subclase Kiitrichida se encuentra evolutivamente entre licnofóridos y *Phacodinium*.

La clase Spirotrichea quedaría constituida, entonces, como sigue:

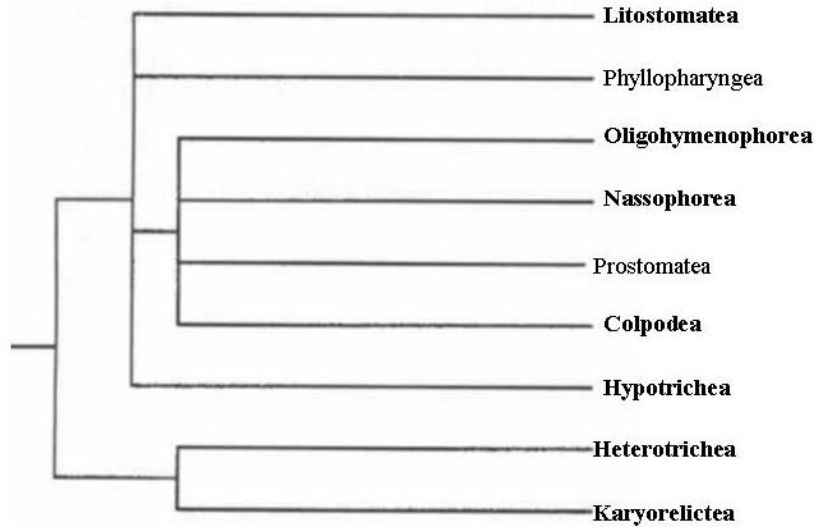
CLASE SUBCLA	SES
Spirotrichea	Stichotrichia
	Choreotrichia
	Oligotrichia
	Hypotrichia
	Phacodiniidia
	Kiitrichida
	Licnophorida
	Protocruziidia

En el congreso europeo sobre ciliados celebrado en Copenhage en 1999, Bardele hizo una reflexión sobre las nuevas propuestas sistemáticas acerca de los protistas, afirmando “estar profundamente convencido de que sólo hay un camino para hacer sistemática y es mediante la sistemática filogenética, es decir, utilizando caracteres sinapomorfos que definan grupos monofiléticos.” Para este autor, sin embargo, la información más sólida y eficaz se obtiene a partir de estudios ultraestructurales comparativos que definen la identidad de un grupo. Posteriormente, según él, habrá que comparar cómo son estas relaciones con los otros grupos monofiléticos hermanos. Aunque esta tarea está todavía muy incompleta, en su opinión, sería mejor confesar las lagunas existentes más que crear grupos parafiléticos o polifiléticos. En este sentido, los datos de las secuencias moleculares nos han permitido por primera vez –nos señala este autor- asegurar posiciones inciertas y redefinir grupos. Pero los árboles evolutivos basados en resultados moleculares no son necesariamente filogenias válidas (alineamientos alternativos, tasas evolutivas desiguales, desacuerdo entre los diferentes algoritmos utilizados) y el autor “se inclina por estudios ultraestructurales y genómicos comparativos que puedan decirnos algún día cómo los genomas han evolucionado mediante la transferencia lateral de genes desde todos los hospedadores temporales a la célula huésped. Mientras tanto tendremos que conformarnos con soluciones imperfectas”.



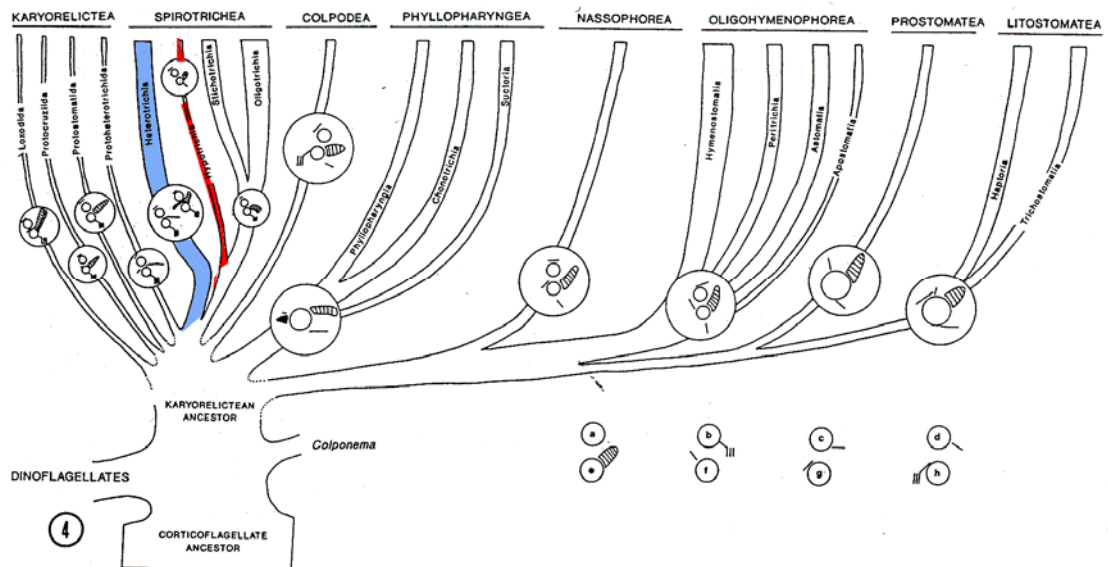


A partir del consenso de los datos obtenidos por análisis del ARNr 18S y el ARNr 28S, Baroin *et al.* (1995,1998) representaron los principales grupos de ciliados con un modelo (fig. 12) en el que los grupos que aparecen destacados se manifiestan como monofiléticos en ambos tipos de marcadores moleculares.

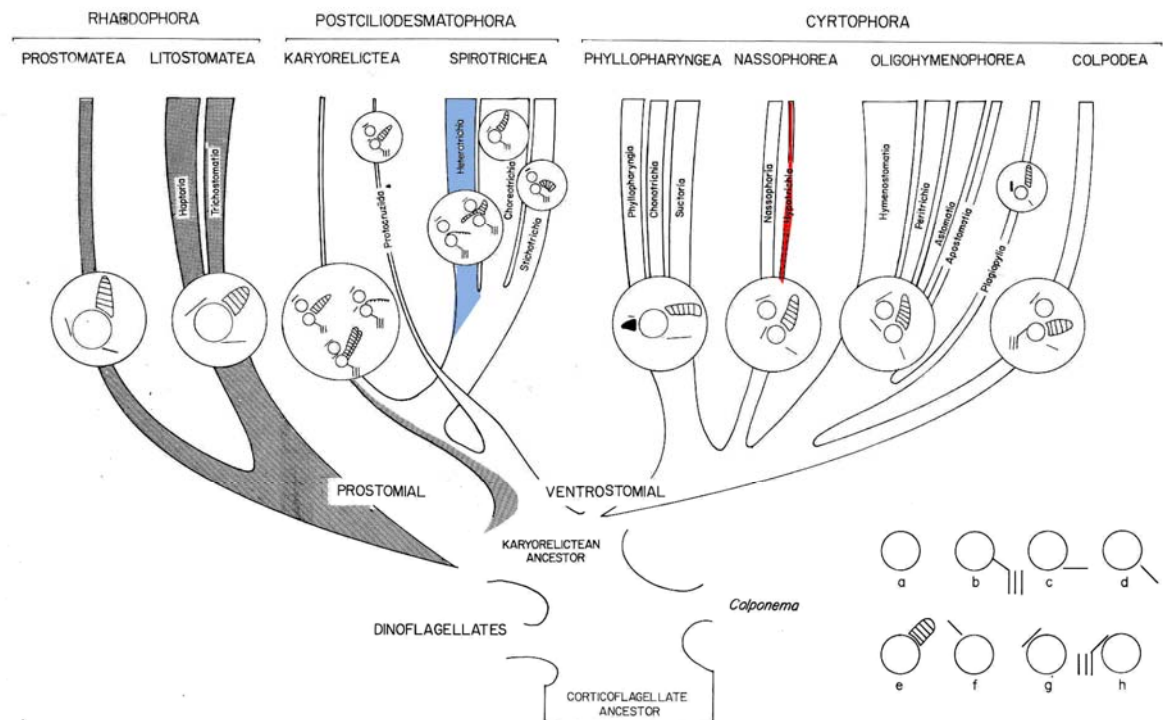
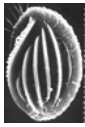


**Fig. 12.** Clases dentro del filo ciliados según Baroin *et al.* (1998). La terminología empleada por estos autores franceses se vale indistintamente del término “Hypotrichea” para referirse a todos los hipotricos, incluidos los no euplotidos. Por tanto, sería equivalente a la clase Spirotrichea.

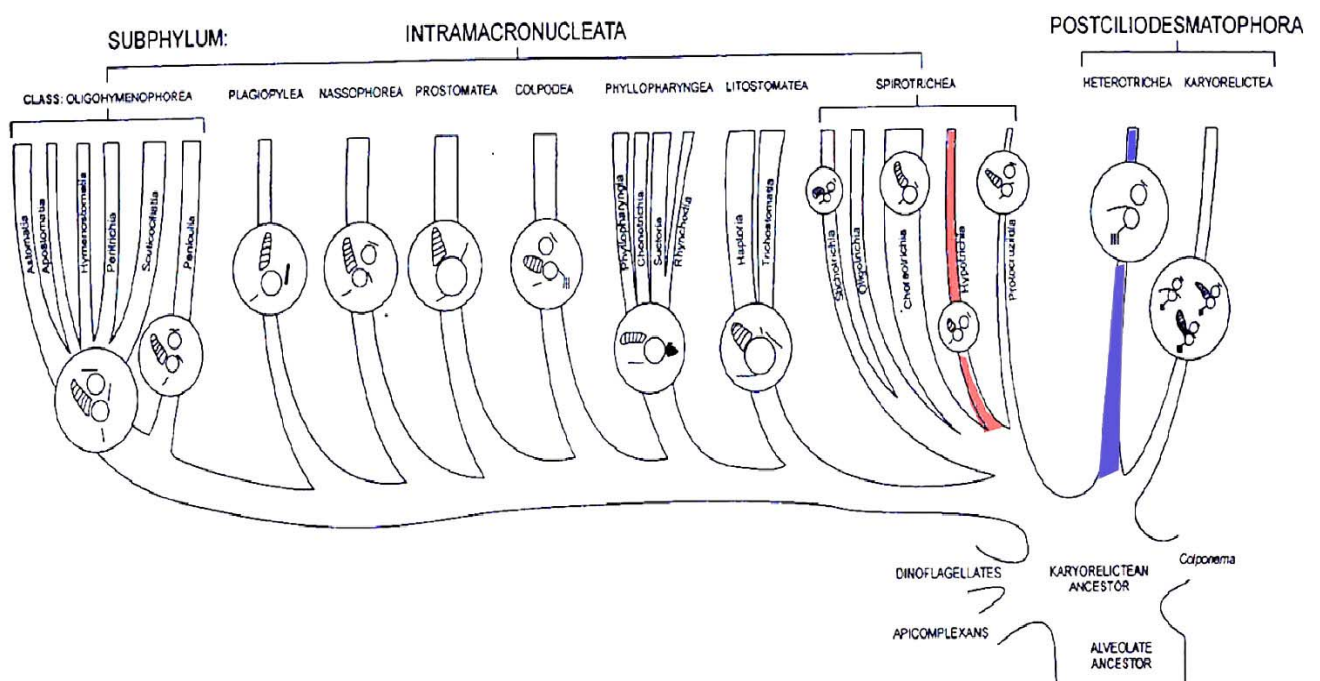
Podemos concluir este recorrido histórico en la sistemática de ciliados con un resumen gráfico que refleja cómo se plantearon, en las tres últimas décadas, las relaciones filogenéticas en este filo. Se han utilizado de base los esquemas realizados por Lynn (figs. 13, 14 y 15), en los que se señalan en color azul la evolución en la posición de heterotricos y en rojo la posición de los hipotricos.



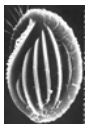
**Fig. 13.** Árbol evolutivo propuesto por Lynn (1981). Primer árbol trazado en 1981, en el que se mostraban las relaciones filogenéticas de los ciliados según el análisis de los derivados cinetosómicos. Los heterotricos se sitúan dentro de la clase Spirotrichea.



**Fig. 14.** Árbol evolutivo propuesto por Small y Lynn (1985). Aparece el subfilo Postciliodesmatophora que se segrega muy basalmente de los otros subfilos. Se mantiene la posición de los heterotricos y llama la atención la posición de los hipotricos entre de los nasoforeos.



**Fig. 15.** Árbol evolutivo propuesto por Lynn y Small (2000). Los ciliados están constituidos por dos subfilos y 10 clases, después de incorporar los principales resultados de los análisis moleculares.



### 1.2.3.2. Proteínas citoesqueléticas como marcadores filogenéticos

La utilización de las proteínas citoesqueléticas como marcadores moleculares comenzó en los años 90. Se han utilizado fundamentalmente la tubulina y la actina, debido a la escasa diversidad que presentan en la secuencia primaria, es decir, lo que se conoce como proteínas citoesqueléticas conservadas. Sus características principales son las siguientes:

#### a) Tubulina

Se trata de la proteína que constituye el mayor componente de los microtúbulos. Es un heterodímero con dos polipéptidos distintos designados como  $\alpha$  y  $\beta$ . Cada subunidad tiene un peso molecular de alrededor de 50.000 Da y está formada por diferentes isotipos.

Varios son los rasgos de esta proteína que la hacen buena candidata para la comparación molecular:

- A causa de su muy baja tasa de evolución, se ha aplicado como indicador filogenético a divergencias muy antiguas en filogenias a gran escala.

- En eucariotas superiores, las tubulinas están caracterizadas por familias multigénicas, mientras que en ciliados existe un número muy reducido (1 a 3) de genes que, por el contrario, codifican proteínas casi idénticas. Un ejemplo es el ciliado *Tetrahymena sp.*, que construye su gran variedad de redes microtubulares a partir de sólo un gen para  $\alpha$ -tubulina y dos genes para  $\beta$ -tubulina, casi o completamente idénticos en su secuencia.

- De hecho, la mayoría de las diferencias en las propiedades de la diversidad microtubular se debe a modificaciones postraduccionales y/o interacciones con proteínas accesorias.

- Los diferentes estudios filogenéticos basados en la  $\alpha$ - o  $\beta$ -tubulina muestran que la divergencia entre las diferentes isoformas no es tan grande como para modificar las relaciones entre especies próximas. La tubulina es una proteína muy conservada en los ciliados y los alveolados, tanto de las secuencias de nucleótidos como de aminoácidos, son muy precisos y no suelen presentar ningún tipo de ambigüedad.

- La comparación de los genes de  $\alpha$ -tubulina de varias clases de ciliados ha mostrado que algunas posiciones de aminoácidos pueden servir para caracterizar grupos taxonómicos.

En relación con los estudios filogenéticos, el principal trabajo ha sido el llevado a cabo por Baroin *et al.* (1998), en el que se han comparado los resultados obtenidos por las filogenias basadas en el ARNr con los de la  $\alpha$ -tubulina o los de la fosfogliceratoquinasa (PGK). Dichos resultados son bastante congruentes y entre ellos destacan los siguientes:



-El grupo de los ciliados aparece como monofilético tanto en el caso de una proteína como en el de la otra.

-En ambos casos, surgen tres grandes grupos monofiléticos que se corresponden con tres clases dentro del filo: los litostomados, los oligohymenoforos y los hipotricos, aunque ésta última clase es menos sólida.

-En el resto de las clases, la tubulina muestra separación entre las distintas ramas, pero no hay una buena resolución, lo que puede deberse o a un pobre poder de resolución de la molécula (lo más probable según los autores) o a una simultánea divergencia de todas las especies aquí incluidas.

En relación a la tubulina, Delgado y Fleury (1993) estudiaron el comportamiento electroforético, cuyo resultado fue un patrón con cuatro tipos de migraciones electroforéticas:

	TIPO
-El de <i>Colpidium</i> + <i>Paramecium</i>	Oligohymenoforo
-El de <i>Isotricha</i>	Litostomo
-El de <i>Loxodes</i>	Karyorelicteo
-El de <i>Euplotes</i> , <i>Paraurostyla</i> y <i>Stentor</i>	Spirotricheo

Las autoras concluyen que las diferentes migraciones pueden ser una consecuencia de la estructura primaria y que, por tanto, aunque no es un método determinante filogenéticamente, sí puede servir para contrastar otros resultados. El agrupamiento de los hipotricos con los heterotricos puede deberse a que ambos han retenido un tipo ancestral de tubulina o a que hay una convergencia evolutiva en estas dos líneas.

#### b) Actina

En el árbol de actina elaborado por Drouin *et al.* (1995), basado en 65 secuencias de actina de 43 especies diferentes, los ciliados aparecen como un grupo parafilético que emerge antes que Percolozoos, Entamoeba, Myxomicetes y Acrasiomycetes, pero después de Euglenozoos. En los estudios basados en el ARNr, los ciliados son un grupo monofilético que emerge después de todos los grupos anteriores, pero antes que la rama que da lugar a plantas, levaduras, hongos y animales.

En estudios recientes (Pérez, 2000), las actinas de los ciliados hipotricos muestran baja semejanza con las actinas convencionales (por ejemplo, la actina de *Oxytricha fallax* presenta sólo un 65% de homología a la descrita para levaduras), además de tener grandes diferencias en la secuencia de aminoácidos en una misma especie. A ello hay que añadir que el contenido en A+T de las secuencias codificantes es más bajo en ciliados hipotricos que en otros ciliados.

Por tanto, aunque determinados resultados de los estudios de actina pueden servir como marcas filogenéticas, no lo son para la construcción de grupos dentro de un árbol filogenético, probablemente por la gran divergencia de la proteína en los ciliados.



c) Otros marcadores filogenéticos.

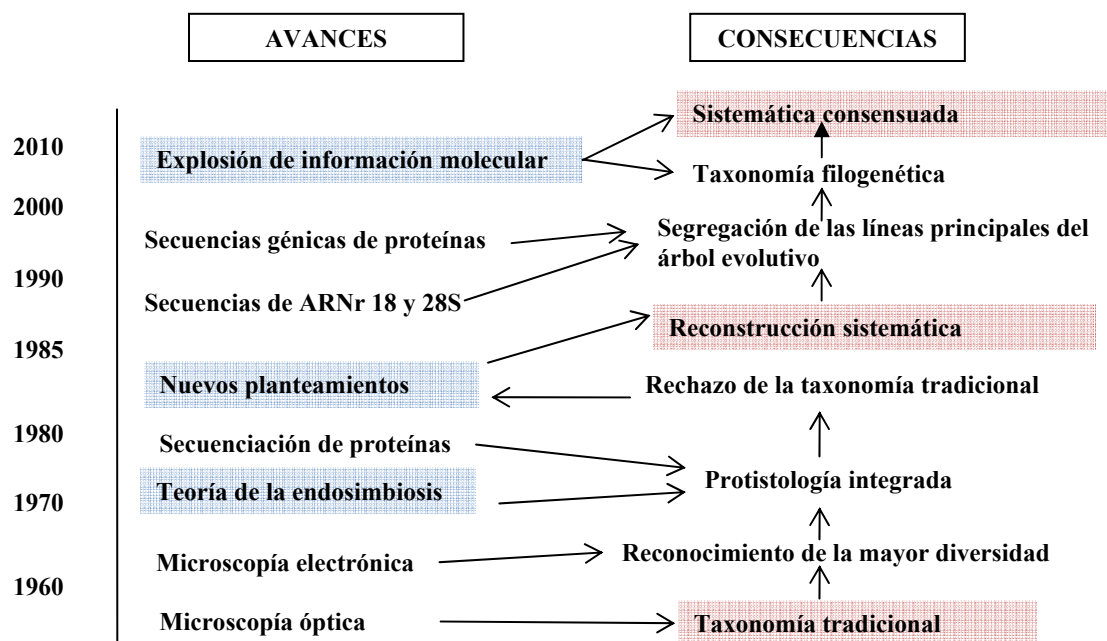
En los últimos años, se han realizado otros estudios con diferentes marcadores, con los que se ha pretendido complementar la información disponible sobre la filogenia de los ciliados.

Por un lado, se han utilizado factores de elongación (EF-1 $\alpha$ ) (Keeling y Doolittle, 1996; Yamamoto, 1997). Los resultados indican que los ciliados forman un grupo de temprana emergencia: anteriores a Euglenozoos y Acrasiomycetes, pero, sin embargo, posteriores a Sporozoos y Entamoeba.

También se ha empleado como marcador filogenético la proteína fosfoglicerato kinasa (PGK) (Baroin *et al.*, 1995; 1998). Los autores señalan la importancia de comparar patrones filogenéticos de proteínas que juegan papeles funcionales diferentes, aunque esta enzima glicolítica está mucho menos conservada que la  $\alpha$ -tubulina.

Otra proteína utilizada ha sido la gliceraldehido 3-fosfato-deshidrogenasa dependiente de NAD (GAPDH), cuya región “S-loop”, situada entre los aminoácidos 183-201, permite diferenciar los eucariotas, procariotas y arqueas y, por tanto, determinar el carácter “primitivo” de las especies analizadas cuando aparecen las marcas características.

En definitiva, la taxonomía de ciliados ha dado un vuelco en los últimos 35 años. Los resultados ultraestructurales y la aceptación de la teoría celular endosimbiótica cambiaron los esquemas tradicionales, que quedaron obsoletos, y la protistología, en la que se integraron los campos tradicionales de ficología y protozoología, se aceptó ampliamente. Por otro lado, la incorporación de los estudios moleculares a los análisis filogenéticos ha sido fundamental en las últimas dos décadas para esclarecer dudas y proponer nuevos árboles evolutivos, resultado del consenso de todos los tipos de análisis (fig. 16).



**Fig. 16.** Esquema en el que se muestran los principales cambios en la protistología evolutiva en los últimos 35 años a partir del realizado por Patterson y Sogin (1992).

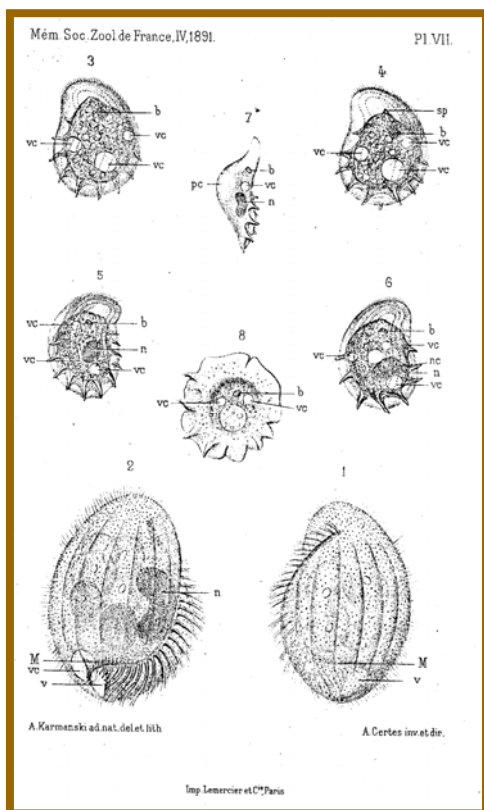
### 1.3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS SOBRE LA ESPECIE ESTUDIADA

#### Elie Metchnikoff (1845-1916)

Merece la primera mención este biólogo ruso, aunque no investigó sobre el ciliado estudiado, porque, en honor a él, se tomó su apellido para el nombre científico de la especie. Metchnikoff estudió en la Universidad de Harkov y posteriormente en la de Huyesen (Alemania), donde, en 1865, descubrió la digestión intracelular en las planarias, pequeños platelmintos de vida libre. Fue profesor de Zoología en San Petersburgo y Odesa, y trabajó en otras universidades europeas (Nápoles y Trieste). En 1883 descubrió el fenómeno de la fagocitosis en larvas de estrellas de mar. Desde 1888 hasta su muerte, trabajó en el Instituto Pasteur en París donde elaboró su teoría sobre la acción defensiva de los fagocitos. En 1908 recibió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina junto con el médico alemán Paul Ehrlich, autor de una teoría inmunitaria humoral opuesta a la suya.



### Certes, 1891.



La primera descripción de *Phacodinium metchnikoffi* se debe al francés Certes (fig. 17). En el artículo “Note sur deux infusoires nouveaux des environs de Paris”, recoge la presencia de un ciliado que el autor considera dentro del género *Conchophthirius*: “[...] sorprende la forma de la boca, la patente membrana ondulante, la fuerza y longitud de los cilios peristomiales [...]”. Otros caracteres le recuerdan, sin embargo, al género *Euplotes*, pero contrariamente a este género no presenta cirros ventrales.

Las especies conocidas del género *Conchophthirius* son parásitas de moluscos, por lo que el autor cree apropiado su inclusión en dicho género pero como una especie nueva, denominada *C. metchnikoffi* en homenaje al científico ruso Elie Metchnikoff (1845-1916).

**Fig.17.** Primera lámina realizada por Certes (1891) con distintos dibujos de *Phacodinium metchnikoffi*.

### Prowazek, 1900.

Será este autor el que a principios del siglo XX haga una revisión del ciliado y decida su inclusión en un género nuevo, *Phacodinium*, y denomine la especie como *Phacodinium muscorum* por el tipo de hábitat - musgos- en el que se encuentra.

### Penard, 1922.

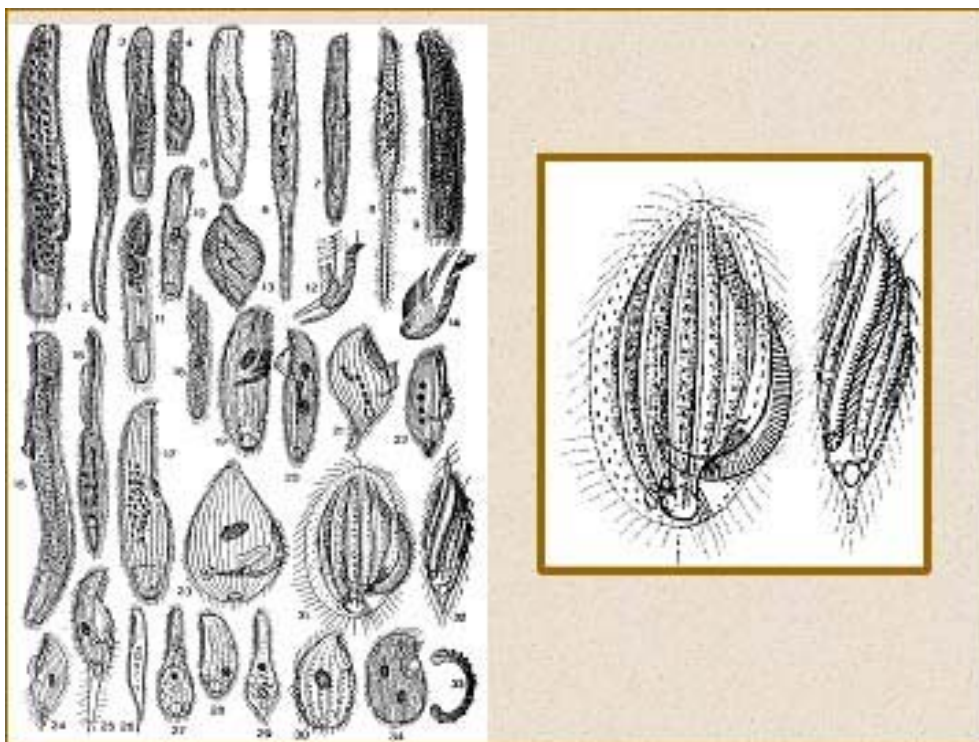
En una nueva revisión, este autor decide recuperar la primera denominación de la especie y el ciliado pasa a denominarse *Phacodinium metchnikoffi*.

### Kahl, 1935.

Es el último autor “antiguo” que hace una descripción del género. Como novedad con respecto a los autores precedentes, señala su parecido con el heterotrico *Blepharisma* y es el primero en describir las numerosas “pestañas” (grupos de cilios) que se distribuyen por la superficie del ciliado (fig. 18).

Kahl lo incluirá, por tanto, entre los heterotricos aunque dentro de la familia Spirostomidae.

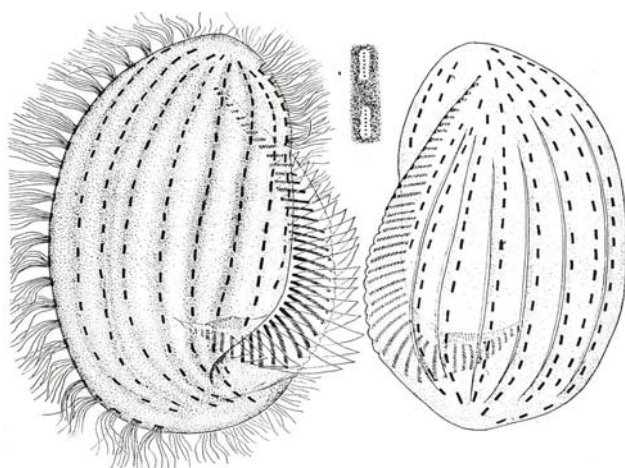




**Fig. 18.** A la izquierda, se ha situado la lámina dibujada por Kahl para representar las especies de la familia Spirostomidae, donde con el número 32 se observa a *P. metchnikoffi*. A la derecha, con mayor detalle se muestra la imagen frontal y lateral del ciliado realizada por Kahl. Estas figuras se han reproducido en muchas de las revisiones posteriores porque presentan de forma detallada la morfología de la célula “in vivo”.

Sin embargo, Kahl, como señala Dragesco (1970), parece haber sido evitado por los autores modernos y no será hasta esta fecha cuando, ya con las técnicas de tinción argéntica, se vuelva a hacer una revisión del género.

#### Dragesco, 1970.



**Fig. 19.** Aspecto general de los lados derecho e izquierdo de *Phacodinium metchnikoffi*.

Remarca este autor el parecido con el género *Blepharisma*, aunque describe tres caracteres que le diferencian de las especies de este género: la ausencia de pigmentos, la ausencia de membrana ondulante y la presencia de una cutícula rígida con marcadas crestas longitudinales.

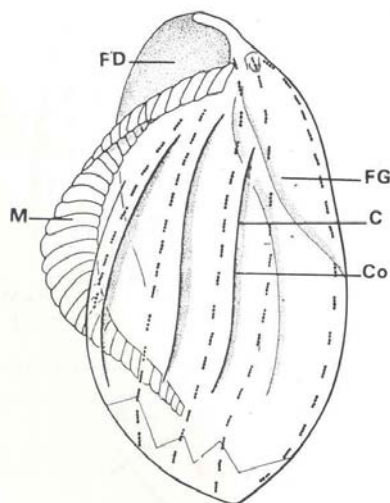
Cada una de las pequeñas pestañas descritas por Kahl consta de cuatro a ocho cinetosomas, detalle extraño entre los heterotricos. Por esta y otras observaciones (fig. 19), el autor

manifiesta su impresión de que se trata de un heterotrico particular que puede justificar la creación de una nueva familia, la Phacodinidae.





**Roque, 1970.**



**Fig. 20.** Esquema de la célula *Phacodinium metchnikoffi*. C: cinetias somáticas; Co: crestas; FD: cara lateral derecha; FG: cara lateral izquierda; M: membranelas.

Las observaciones de este autor se basaron en la impregnación argéntica de Chatton-Lwoff y la de protargol. Se trata de una descripción magnífica de los caracteres morfológicos, aunque no hay ninguna mención a la sistemática del ciliado. Como ejemplo de la “retórica” descripción de Roque, reproducimos aquí uno de sus textos:

“Se parece a un bucono, molusco gasterópodo, a causa de la larga y profunda fosa peristomial espiralada que escota el cuerpo, desde su ápice, a la izquierda, hasta su región posterior, a la derecha”.

“Un infundíbulo estrecho prolonga el peristoma y se abre dentro del citostoma, después de haberse extendido, según dos planos perpendiculares, en el último tercio del ciliado, a la derecha” (fig. 20).

**Didier y Dragesco, 1976.**

Los trabajos previos de Dragesco (1970) son retomados por estos dos autores franceses, quienes, en la XV reunión de Protistólogos de Lengua Francesa (1976), presentaron una comunicación con una serie de resultados ultraestructurales. Estas observaciones fueron ampliadas en dos trabajos que se relacionan a continuación:

**\*Didier y Dragesco, 1979a.**

Se trata de una curiosa aportación en la que se describe el córtex ultraestructural de las vacuolas digestivas (véase el capítulo IV “Resultados”). Las microvellosidades que aparecen en la luz vacuolar son comparadas con las que aparecen en el intestino de metazoos, lo que supondría un llamativo caso de convergencia evolutiva.

**\* Didier y Dragesco, 1979b.**

Representa el primer estudio detallado realizado al microscopio electrónico en el que se describen las formaciones microtubulares y otros aspectos del córtex, comparándolos con los resultados obtenidos para heterotricos. Se plantea, por primera vez, “la particular posición de *Phacodinium metchnikoffi* entre los heterotricos, de forma que un estudio completo, con los orgánulos bucales, podría conducirnos a situarlo en un lugar más importante que el que le ha sido asignado”.



**Dragesco y Dragesco-Kerney, 1986.**

Se trata de una relación de ciliados libres del África intertropical, lo que indica su distribución “cosmopolita”. De nuevo, se sugiere la posible “tendencia evolutiva hacia los hipotricos” basada en la estructura de las paletas filiares, posibles antecesores de los cirros, y se señala la posibilidad de que la única especie conocida hasta ese momento responda, en realidad, a especies distintas.

**da Silva Neto, 1993.**

La herencia de los estudios de los ciliatólogos franceses la recibe un brasileño, da Silva Neto, que realizó su tesis en Clermont-Ferrand. Este autor, especialista en heterotricos, lleva a cabo un detallado estudio a microscopía electrónica, cuyos datos son contrastados en el capítulo IV, “Resultados” de esta tesis. En relación con la posición taxonómica del ciliado, sin ser concluyente, se decanta por la de un grupo entre los heterotricos y los hipotricos.

**Shin *et al.*, 2000.**

Los autores llevan a cabo la secuenciación de los genes de la subunidad pequeña de ARNr de dos géneros, *Phacodinium* y *Protocruzia*, de posición filogenético incierta, para confirmar su inclusión en la clase Spirotrichea. Esta secuenciación, como la anterior, aleja a estos ciliados de los heterotricos y los sitúa en la base evolutiva de la clase Spirotrichea, como subclases Protocruziida y Phacodiniida.

## **II. OBJETIVOS**

---



Los sistemas de clasificación de los ciliados se han basado tradicionalmente en criterios morfológicos, especialmente en el patrón ciliar (somático y oral) y sus modificaciones durante el proceso de morfogénesis, si bien las propuestas han diferido dependiendo de si se consideraban prioritarias las características del córtex somático o las del bucal.

A finales del siglo XX, con el auge de las técnicas moleculares, se obtuvieron nuevos datos en relación a las secuencias de ARN, ADN y proteínas de ciliados. Como consecuencia, entonces se produjeron varios intentos de reconstrucción filogenética en los ciliados, basados principalmente en secuencias de ARNr y proteínas conservadas.

Los criterios de clasificación taxonómica de los protistas, entre ellos el grupo de los ciliados, están en la actualidad en revisión, debido al conocimiento progresivo de nuevos datos estructurales, fisiológicos y moleculares.

En este estudio, nos hemos planteado la utilización de un organismo modelo, *Phacodinium metchnikoffi*, con una posición filogenética incierta, con el objetivo principal de realizar un estudio de las características morfológicas, morfogenéticas y moleculares, y valorar su importancia en la clasificación filogenética y taxonómica.

Los objetivos planteados con este fin han sido los siguientes:

1. Determinación del patrón cortical de *Phacodinium metchnikoffi*, que defina su configuración ciliar, tanto somática como oral, así como los componentes microtubulares asociados al córtex, mediante la comparación de los resultados obtenidos con microscopía óptica (técnicas clásicas de impregnación argéntica e inmunocitoquímicas) y microscopía electrónica de transmisión y barrido.
2. Estudio del patrón morfogenético y del modelo de estomatogénesis en este ciliado.
3. Caracterización de la morfología y ultraestructura de los quistes de resistencia.
4. Secuenciación de los genes que codifican ARNr 28S y  $\alpha$ -tubulina.
5. Determinación de la posición filogenética del ciliado en función de los distintos marcadores moleculares.
6. Valoración de las diferentes propuestas filogenéticas para los ciliados en función de los criterios utilizados y, en consecuencia, revisión de la sistemática de los ciliados.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

---



### 3.1. EL MATERIAL BIOLÓGICO

#### 3.1.1. Su procedencia y condiciones de cultivo

##### A) Cultivo de *Phacodinium metchnikoffi*

Este ciliado fue aislado a partir de muestras de musgos asociados a roca procedentes tanto del Hayedo de Montejo de la Sierra (Madrid), como del tramo alto del río Guadarrama, en Cercedilla (Madrid) (fig. 21); en cuanto a los trabajos que realizamos en Orsay (Francia), las muestras de musgos procedían de la región de l'Auvergne.

Aunque se recogieron muestras de otras áreas, sólo se encontró el ciliado mencionado en las zonas descritas, en las que se presentaba asociado a los musgos *Calliergonella cuspidata*, *Hypnum cupressiforme* var. *mammillatum* y *Leucodon sciuroides* (Ron *et al.*, 1983).

Una vez en el laboratorio, las muestras se colocaron en grandes bandejas o sobre placas de Petri, a las que se añadió agua mineral. El mantenimiento de las muestras se realizó según el método de la placa de Petri no inundada descrito por Foissner (1992).



Los cultivos se realizaron a partir de 20-30 individuos aislados directamente con una micropipeta y cultivados en el medio de Pringsheim, suplementado regularmente (cada 8-10 días) con los flagelados *Chlorogonium sp* y *Chlamydomonas sp*. La temperatura óptima de crecimiento fue de 20-25°C.

##### B) Cultivo de *Chlorogonium elongatum*

Se trata de un flagelado fotosintético. Sus cultivos se realizaron en matraces estériles de 2 litros de capacidad con el medio Jaworski (JM) (Thompson *et al.*, 1988). Los cultivos se mantuvieron bajo aireación constante, a temperatura ambiente y en presencia de luz blanca (tubos fluorescentes silvana F18W).

En lo que respecta al medio Jaworski (JM), hay que precisar que a la composición descrita por Thompson se le ha sustituido el EDTA NaFe por sulfato férrico en la misma concentración.



### 3.1.2. Condiciones de enquistamiento y preparación de quistes de resistencia

El factor inductor del enquistamiento fue la inanición: después de 1 hora el 60% de las células aisladas (sin *Chlorogonium*) en una placa Petri con agua mineral comercial estaban en estado prequístico (sin espinas) y el 90% produjeron quistes de resistencia en 12 horas. No obstante, el enquistamiento también estuvo condicionado por la temperatura, de forma que el mayor porcentaje de células enquistadas se obtuvo a 37° C.

Para separar los quistes de materiales contaminantes y eliminar las formas vegetativas, se procedió a la centrifugación en un gradiente discontinuo de Percoll (Pharmacia): quistes/agua/Percoll (1:1:1) durante 15 s a 28.000 g. Se recogieron así los quistes en el sedimento, tras lo cual se lavaron tres veces con tampón de enquistamiento (Tris/HCl 10 mM, pH 6,8). Finalmente, los quistes se resuspendieron en este mismo tampón y se almacenaron a 4°C. Se observó que, a las 12-14 horas del comienzo del proceso, se había completado mayoritariamente el proceso de enquistamiento.

## 3.2. TÉCNICAS MORFOLÓGICO-CITOLÓGICAS

### 3.2.1. La observación “in vivo”

El examen de los individuos “in vivo” se realizó utilizando una lupa binocular NIKON modelo SMZ-2T y, tanto en campo claro como en contraste de fases, un microscopio óptico ZEISS III.

### 3.2.2. La observación con microscopía óptica

#### A) Tinción argéntica: método de Fernández-Galiano (1976, 1994)

La elección de este método se hizo por las siguientes razones:

- Permite una impregnación rápida (unos 3 minutos) de los microorganismos y, por tanto, la inmediata aplicación a muestras en las que se han observado procesos de morfogénesis o enquistamiento.

- Pone de manifiesto con gran nitidez la infraciliación, tanto oral como somática, así como los sistemas fibrilares asociados a los mismos, característica de gran importancia sistemática en los ciliados y uno de los objetivos de este estudio.

- También se pueden observar la dotación macro y micronuclear de las células vegetativas e igualmente el modo como éstas se comportan en el proceso de división.

Este método de impregnación de Fernández-Galiano (1976; véase también 1966) ha sido utilizado con éxito en la identificación de muchas especies de ciliados. Para evitar la sobrecoloración de las células, hemos empleado una variante (Fernández-Galiano, 1994) cuya principal modificación consiste en el empleo de una nueva fórmula



del carbonato de plata amoniacal, que añade, en vez de agua destilada, una solución de carbonato sódico al 5%, una vez que el carbonato de plata ha precipitado.

La obtención de preparaciones permanentes se realizó según los protocolos descritos por Fernández-Galiano (1966) y Agustín *et al.* (1984).

Las microfotografías de los individuos impregnados fueron realizadas en un microscopio OLYMPUS BH-S con cámara fotográfica incorporada. Las películas empleadas fueron AGFAPAN 25 y KODAK TX-100.

### B) Inmunocitoquímica

Los siguientes anticuerpos monoclonales fueron empleados para caracterizar el citoesqueleto cortical. Se señalan en negrita los dirigidos frente a las modificaciones postraduccionales de la  $\alpha$ -tubulina. Todos ellos fueron amablemente cedidos por el Prof. Adoutte.

Nombre vulgar del anticuerpo	Denominación	Especificidad a la tubulina	Dilución	Referencia
<b>TEU 318/348</b>	Ac 1	$\alpha$ -acetilada	1:10 (SN)	Callen <i>et al.</i> (1994)
TEU 435	$\alpha$ S	Secuencias $\alpha$ Nt	1:4 (SN)	Callen <i>et al.</i> (1994)
TAP 952	TAP 952 (A)	PTM ( $\alpha + \beta$ ) Ct Epitopo C	1:10 (SN)	Callen <i>et al.</i> (1994)
<b>AXO 49</b>	AXO 49 (C)	PTM (( $\alpha + \beta$ ) Ct Epitopo A	1:5 (SN)	Callen <i>et al.</i> (1994) N. Levilliers (no publicado)
<b>GT 335</b>	GT 335	Tubulina glutamilada	1:100	Wolff <i>et al.</i> (1992)
CTR210	CTR210	Material pericentriolar	1:4 (SN)	Bailly <i>et al.</i> (1988)
<b>YOL ½</b>	YOL1/2	Tubulina tirosilada	1:2	Wheland <i>et al.</i> (1983)
33	EPI33	Epiplasma	1:2	Jean-Maire Wolf <i>et al.</i> (1993)

**Tabla I.** Anticuerpos utilizados en los estudios inmunocitoquímicos. SN: Sobrenadantes de cultivos de hibridomas

### B<sub>1</sub>) Microscopía de inmunofluorescencia indirecta

Para la tinción específica con anticuerpos antitubulina, se siguió el siguiente protocolo:

1.-Permeabilización.





Las células se permeabilizaron durante 10 minutos con Triton X-100 al 1% en tampón Phem. Para la detección de algunas estructuras microtubulares no observables tras la permeabilización con Triton, se utilizó saponina al 0,5% en el mismo tampón.

Para evitar la despolimerización de las redes internas de microtúbulos, se pretrataron las muestras con leupeptina, proteasa en solución madre de 10 mg/ml en una proporción de 4 µg/ml. El control de la permeabilización se realizó directamente observando las muestras a la lupa binocular.

#### 2.-Lavado.

Una vez permeabilizadas, las células se lavaron tres veces con Phem para eliminar al máximo el detergente.

#### 3.-Fijación.

La fijación se realizó con paraformaldehído al 2 % en Phem. Se añadió 1 ml del fijador por cada ml de muestra y se dejó actuar durante 45 minutos.

#### 4.-Lavado.

Se hicieron dos o tres lavados en el tampón PBS, al que se le añadió 3% de BSA, 0,1% de Tween-20 y 0,25% de saponina.

#### 5.-Incubación en el primer anticuerpo.

El anticuerpo se utilizó diluido en el tampón PBS, del que se añadieron 200 µl del mismo sobre la muestra durante 20-30 minutos.

#### 6.-Lavado.

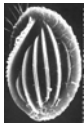
Las células se lavaron tres veces con 400µl de PBS-BSA-Tween y se mantuvieron las células en el tampón durante 15 minutos.

#### 7.-Incubación en el segundo anticuerpo.

Se empleó FITC anti Ig G (H+L) de ratón de la marca Pasteur (Paris), diluido en el mismo tampón, PBS, que en etapas anteriores. Se añadieron 200 µl por muestra y el tiempo de incubación fue de 45 minutos.

#### 8.-Lavado.

Se procedió igual que en el paso nº 6. En el último lavado, se añadieron 2 µl/ml de Hoechst para la visualización de los macronúcleos, lo cual permitió una rápida identificación de las formas en división.



#### 9.-Montaje.

Se depositó una pequeña gota de citifluor glicerol/PBS (TedPella Inc. 19470) en el centro de un portaobjetos muy limpio. Se transfirieron las células una a una, depositándolas lo más separadas posible para evitar la formación de burbujas.

#### 10.-Observación.

Las preparaciones se observaron en un microscopio de fluorescencia LEITZ WETZLAR GERMANY y fueron fotografiadas con película KODAK T-MAX 400 TMY 135-24.

### B<sub>2</sub>) Microscopía confocal

Se obtuvieron también imágenes en dos microscopios confocales:

-Nikon MRC 600 equipado con láser argon. Los datos fueron procesados de la forma ya descrita por otros autores (Laurent *et al.*, 1992) con el fin de obtener proyecciones de la máxima calidad.

-Microscopio confocal ultraespectral con rango de excitación ultravioleta y visible LEICA TCS-SP2-AOBS-UV. El láser utilizado fue argon con potencia 5 mw.

### 3.2.3. La observación con microscopía electrónica

#### A) Microscopía electrónica de transmisión

La preparación de las muestras para el microscopio electrónico de transmisión se realizó según el siguiente protocolo:

##### 1.-Fijación.

Los ejemplares fueron fijados con una solución de glutaraldehído al 2,5% (células vegetativas) o del 6% (quistes). La fijación se llevó a cabo en frío seco durante 30 minutos.

##### 2.-Lavados.

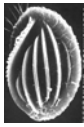
Se realizaron dos lavados centrifugando las muestras en tampón cacodilato sódico.

##### 3.-Post-fijación.

Las células fueron fijadas de nuevo con una solución de tetróxido de osmio al 1% en tampón cacodilato sódico al 1% durante dos horas. El fijador fue lavado por centrifugaciones sucesivas con tampón cacodilato sódico.

##### 4.-Deshidratación.

Las muestras se trataron con una serie de alcoholes (45°-60°-90°-etanol absoluto) y, finalmente, con óxido de propileno.



#### 5.-Inclusión.

Las células fueron incluidas en Epon-812, y se dejó polimerizar la resina durante 2-3 días.

#### 6.-Obtención de secciones ultrafinas.

Se obtuvieron cortes ultrafinos con un ultramicrotomo REICHERT Om U3. Las muestras se montaron sobre rejillas de cobre recubiertas con Formvar y se tiñeron con soluciones de acetato de uranilo y de acetato de plomo para lograr un buen contraste de las estructuras. Los cortes fueron observados y fotografiados en un microscopio electrónico JEM 100B.

### **B) Microscopía electrónica de barrido**

El procedimiento empleado es el que utiliza el punto crítico como método de desecación. Implica la sustitución en las muestras biológicas del agua por alcohol y del alcohol por CO<sub>2</sub> líquido.

#### 1.-Preparación de las muestras.

Se “pescaron” los individuos directamente en la lupa binocular por medio de una micropipeta y se concentraron en un portaobjetos excavado.

#### 2.-Fijación.

Los individuos se fijaron en una solución Parducz (6 volúmenes de OsO<sub>4</sub> al 2% en agua bidestilada y 1 volumen de una solución saturada de HgCl<sub>2</sub>) durante 25-30 minutos.

#### 3.-Lavados.

Las células fijadas se lavaron dos veces en tampón cacodilato de sodio 0,1 M (5,35 g de cacodilato de sodio en 250 ml de agua bidestilada, ajustando el pH final a 7,4) y, una vez más, en agua destilada.

#### 5.-Montaje.

Las células se depositaron una a una con una micropipeta sobre pequeños fragmentos de cubreobjetos impregnados en Poli-L-lisina.

#### 6.-Deshidratación.

Las células se deshidrataron gradualmente en series de alcoholes (50-75-95-etanol absoluto, éste último dos veces).

#### 7.-Punto crítico.



Asegura la conservación de la estructura tridimensional de los especímenes. El método está basado en la existencia de una temperatura y una presión críticas ( $31^{\circ}\text{C}$  y 1.100 psi), en las cuales el  $\text{CO}_2$  pasa de estado líquido a gaseoso. El ejemplar se secó entonces con una tensión superficial de 0 en la interfase gas-líquido. Se utilizó un aparato BALZERS modelo CPD 030.

#### 8.-Sombreado.

El sombreado con oro se realizó en un BALZERS modelo SCD 004 durante 4 min.

#### 9.-Observación.

Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 6400.

### 3.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS MOLECULAR

#### 3.3.1. Aislamiento de ácidos nucleicos

Tanto para el aislamiento del ADN como del ARN, se realizó previamente una recogida de las células vegetativas a través de dos filtros de nailon (Millipore): el primero, con un tamaño de poro de  $100\ \mu\text{m}$ , retiene los flóculos producidos por el alga que sirve de alimento y sustancias de desecho; el segundo, con  $11\ \mu\text{m}$  de tamaño de poro, retiene las células del ciliado, que son recogidas con una pipeta Pasteur y repartidas en tubos de centrifuga.

Posteriormente, las células se sedimentaron mediante centrifugación a  $1.000 \times g$  durante 10 minutos a temperatura ambiente.

#### A) Aislamiento del ADN genómico

Hay que distinguir estos dos casos:

##### A<sub>1</sub>) Secuenciación del gen de la $\alpha$ -tubulina:

El procedimiento utilizado ha sido el descrito por Steinbrück (1981), pero con ciertas modificaciones:

1.- A  $0,5\ \text{ml}$  de sedimento celular se añadió  $1\ \text{ml}$  de tampón de lisis ( $10\ \text{mM}$  Tris-HCl,  $\text{pH}$  8;  $5\ \text{mM}$  EDTA,  $\text{pH}$  8;  $100\ \text{mM}$  NaCl,  $1\ \%$  SDS) y se incubó durante una hora a  $60^{\circ}\text{C}$ . Una vez lisadas las células, se añadieron  $100\ \mu\text{g/ml}$  de proteinasa K de la solución stock  $20\ \text{mg/ml}$  y se incubaron durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ .

2.- Posteriormente, para la eliminación de los restos celulares y de las proteínas, se procedió de la siguiente manera:



-En primer lugar, se añadió a la muestra un volumen equivalente de reactivo de Holmes-Bonner fenol-cloroformo-isoamílico 25:24:1, que se agitó vigorosamente y se centrifugó a 13.000 x g durante 5 minutos tres veces.

-Una vez recuperada la fase acuosa tras la centrifugación, se eliminaron los restos de fenol añadiendo cloroformo-álcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó de nuevo y se separó la fase acuosa.

-Por último, el ADN libre de restos celulares se precipitó al añadir 1/10 del volumen final de acetato sódico 3M pH 5,2 y 1,5 ml de etanol absoluto, y se incubó durante 1 hora a -20° C. Se procedió entonces a la centrifugación a 15.110 x g durante 30 minutos y se lavó dos veces con etanol al 70% (v/v). Se secó y se resuspendió en un tampón TE (Tris-EDTA), que contenía 1 mg/ml de ARNasa (Boehringer-Mannheim) para eliminar el ARN. Se conservó a 4°C.

Descripción y modo de empleo del tampón utilizado:

**Tampón TE**

Tris	10mM
EDTA	0,1mM

Se ajusta el pH a 8 y se esteriliza en autoclave.

**A<sub>2</sub>) Aislamiento del ARN ribosomal**

Se aplicó en la secuenciación directa del ARNr 28S.

La extracción se realizó según Baroin *et al.* (1988, 1992). Básicamente, las células homogeneizadas se colocaron en una solución de NaDodSO<sub>4</sub> a temperatura ambiente (5% NaDodSO<sub>4</sub> /50 mM TrisCl, pH 7,4/0,15 M NaCl/ mM EDTA).

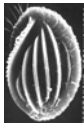
El total de ARN se precipitó por la adición de etanol. Se centrifugó y el sobrenadante se resuspendió en agua destilada en 2 µg/ µl.

**3.3.2. Medida de la concentración y pureza de ácidos nucleicos**

**3.3.2.1. Fase previa a la electroforesis**

La concentración y pureza de los ácidos nucleicos se determinó por la medida de la absorbancia en un espectrofotómetro. La relación de absorbancia a 260/280 nm nos informa sobre la pureza de los ácidos nucleicos y el valor de la absorbancia a 260 nm nos permite estimar la concentración de ácidos nucleicos existentes en la muestra.

Se considera que el ADN es puro cuando la relación 260/280 nm está entre 1,8 y 2 µg/ml. Por otro lado, la concentración de ADN se estimó teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 50 µg/ml de ADN de doble cadena (Sambrook *et al.*, 1989).



En el caso del ARN, la relación 260/280 nm debe aproximarse a 2 y 40 µg/ml de una solución de ARN con una absorbancia de 1 a 260 nm (Sambrook *et al.*, 1989).

### 3.3.2.2. Realización de la electroforesis de ADN

Las electroforesis de ADN fueron efectuadas en geles de agarosa (Seakem LE, FMC) al 1% (Sealeg y Southern, 1982). A los geles se le añadió bromuro de etidio en una concentración de 0,8 mg/ml, que actúa como agente intercalante que se une al ADN y que emite fluorescencia al irradiar con luz ultravioleta a 240 nm. Las muestras se cargaron en los pocillos mezcladas con tampón de carga y la separación de ADN se llevó a cabo aplicando un voltaje entre 70-90 V en tampón TBE. Como marcador de peso molecular se utilizó el ADN del fago λ (Boehringer-Mannheim) digerido con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *Hind III*. Para estimar tamaños menores a 1 Kb, se utilizó una mezcla de fragmentos de ADN de tamaños comprendidos entre 100 y 1.500 pb (Boehringer-Mannheim). Los fragmentos de ADN se visualizaron utilizando un transluminador de luz ultravioleta. Las imágenes se captaron con una cámara de video y se procesaron con un equipo de tratamiento de imágenes (TDI).

Descripción de los tampones utilizados en la electroforesis:

**Tampón de carga:**

0,25% Azul de bromofenol

0,25% Xylen cyanol FF

30% (v/v) Glicerol

**Tampón TBE:**

128 mM Tris

24 mM Ácido bórico

42 mM EDTA

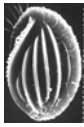
### 3.3.3. Amplificación del ADN por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

#### 3.3.3.1. Diseño de cebadores

Para el diseño de los cebadores, se utilizó el paquete informático de la Universidad de Wisconsin (Devereux *et al.*, 1984), proporcionado por el “Genetic Computer Group” (GCG); y, para ver estructuras secundarias, el programa Oligos 4.0.

Los cebadores degenerados correspondientes a ARNr 28S fueron tres oligonucleótidos complementarios de los segmentos conservados 51-75, 278-302 y 382-404, referidos a la secuencia de *Mus musculus*.

Los cebadores degenerados para la amplificación de la α-tubulina se sintetizaron a partir de las secuencias de aminoácidos referidas a la α-tubulina de *Tetrahymena pyriformis* CLHGIQ (posiciones 25-31) y MEEGEF (posiciones 413-418). Debido a que algunos aminoácidos pueden ser codificados por más de un codón, se introdujeron las degeneraciones necesarias en la secuencia de oligonucleótidos, siempre teniendo en cuenta el código genético de ciliados (Baroin *et al.*, 1995).



Para las degeneraciones se siguió el código siguiente: R: purinas (guanina o adenina); Y: pirimidinas (timina o citosina); V:guanina (citosina o adenina), y K: nucleótidos con grupo ceto (guanina o timina).

NT2 5'-TGYYTKGAGCAYGGTATYCAACC-3'  
CT2 5'-SAGAAYYTCTCCTTCYTCCAT-3'

### 3.3.3.2. Condiciones de amplificación

#### A) Para la $\alpha$ -tubulina

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Saiki (1990). El volumen de reacción fue de 100  $\mu$ l, que contenía ADN molde; 10 mM Tris pH 8,3; 50 mM KCl; 2 mM  $MgCl_2$ ; 200  $\mu$ M de una mezcla de los deoxinucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP); 25 pmoles de cada cebador y 5 unidades de Taq ADN polimerasa (Boehringer); recubierto todo por 40  $\mu$ l de aceite mineral (Sigma) para evitar la evaporación. La reacción se incubó en un termociclador BIOMETRA-TRIO-THERMOBLOCK con los siguientes ciclos de temperatura:

El programa utilizado para la reacción en cadena de la polimerasa fue el siguiente:

1 ciclo: 94°C, 4 min. (temperatura de desnaturalización).

$T_m$  (temperatura media de hibridación del cebador menos 5°C), 30s.

72°C, de 30s a 1 min. (tiempo de polimerización según el tamaño del fragmento que hay que amplificar).

35 ciclos: 94°C, 30s

$T_m$ , 30s

72°C, de 30s a 1 min.

Último ciclo: 72°C, 10 min.

#### B) Para el ARNr 28S

Se utilizó la transcriptasa inversa según el procedimiento de Baroin *et al.* (1988).

El programa utilizado fue igual que el anterior excepto lo siguiente:

35 ciclos: 94°C, 1 min.

$T_m$ , 1 min.

72°C, 1 min.

Una vez finalizado el proceso, se añadió tampón de muestra en proporción 2:1 y se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa en tampón TBE (1x), a la que se adicionó 3:1 del agente intercalante bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta.



El peso molecular de los fragmentos de ADN amplificado se determinó utilizando como patrón el ADN del bacteriófago lambda tratado con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*.

### 3.3.4. Purificación del ADN a partir de geles de agarosa

Los productos de amplificación fueron recuperados de la agarosa utilizando el KIT QIAEX (DIAGEN GmbH).

Siguiendo las instrucciones del sistema, se cortó el bloque de agarosa que contenía el ADN deseado, se pesó y se añadió solución de solubilización en proporción 300:100 (ml de solución: mg de agarosa) y solución salina en la proporción 0,05 ml de solución: mg de agarosa. A continuación, se incubó a 55°C durante 5 minutos para permitir la solubilización de la agarosa. Transcurrido este tiempo, a la mezcla se le añadieron 10 µl de una resina con partículas de sílice, a las cuales se une el ADN. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, agitándolo cada minuto; posteriormente, se centrífugo 2 minutos a 13.000 x g y se eliminó el sobrenadante.

Seguidamente, a las partículas de sílice sedimentadas se añadieron 500 µl de una solución de lavado, se resuspendió y la mezcla se volvió a centrifugar 30 seg., cuyo sobrenadante finalmente se descartó.

Por último, para eluir el ADN de las partículas de sílice, se añadieron 20 µl de TE, y se incubó la mezcla a 50°C durante 5 min, para después centrifugar y recuperar el sobrenadante.

### 3.3.5. Clonación

Para conseguir la clonación, llevamos a cabo las siguientes fases:

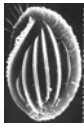
#### 3.3.5.1. Preparación de la ligación

##### A) Para la $\alpha$ -tubulina

Se empleó el plásmido pGEM-T (Promega). Se trata de un plásmido derivado del pGEM-5Zf(+) obtenido por corte con la enzima *EcoRV* y adición de deoxitimina en sus extremos 3' mediante una transferasa terminal (Robles y Dores, 1994). Estas colas de ADN de cadena simple 3'-T del sitio de inserción aumentan la eficiencia de ligación para productos resultado de PCR, ya que previenen la recircularización del vector al proporcionar colas compatibles a las generadas en la PCR por las polimerasas termoestables usadas, las cuales han añadido deoxiadenina al extremo 3' de los fragmentos amplificados.

La ligación se realizó a temperatura ambiente durante 3 horas, en una mezcla de reacción de 10 µl que contenía 30mM TrisHCl pH 7,8; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT; 0,5 mM ATP; 5% PEG; 55 ng de vector; 3 U de T4 ligasa (Promega) y una cantidad apropiada de ADN. Esta cantidad se calculó mediante la siguiente ecuación:





$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{Kb de inserto}}{\text{Kb del vector}} \times \text{proporción inserto:vector} = \text{ng de inserto}$$

La proporción inserto: vector utilizada fue 3:1

### **B) Para el ARNr 28S**

El vector seleccionado fue el plásmido pUC18 tratado con la enzima de restricción SITICI I (*Sma*I) desfosforilada, que corta el plásmido en el interior del segmento de poliunión 396-454, exactamente en la posición 411 (Yanisch *et al.*, 1985).

Posteriormente, se procedió a la preparación del fragmento originado por PCR para su correcta inserción, ya que, como se ha comentado anteriormente, las polimerasas usadas en la amplificación añaden deoxiadenina al extremo 3' de los fragmentos amplificados.

#### **B<sub>1</sub>) Desfosforilación del ADN**

Primero, se trató con la enzima klenow (Boehringer-Mannheim). La reacción se realizó en 15 µl que contenía 50mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl; 10mM MgCl<sub>2</sub> y 1 µl de la enzima. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente para favorecer la actividad exonucleasa. Seguidamente, se añadieron 2 µl de 1mM de dNTPs para potenciar la actividad polimerasa de la enzima y se incubó durante otros 10 minutos, tras los cuales se inactivó la enzima durante 10 minutos a 75°C. Posteriormente, el ADN se precipitó y se resuspendió en tampón TE.

#### **B<sub>2</sub>) Fosforilación del ADN**

El inserto debe estar fosforilado para conseguir la ligación. La reacción se realizó en un volumen de 10 µl que contenía 50mM Tris pH 8,2; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM EDTA; 5 mM ditriotretitol; 0,1 mM espermidina; 1 mM ATP y 10 unidades de la enzima T4 polinucleótido Kinasa (Boehringer). Se incubó 30 min a 37°C y posteriormente la enzima se desactivó añadiendo 20mM EDTA pH 9 e incubando 10 min. a 75°C. El ADN se precipitó de la forma ya descrita.

#### **B<sub>3</sub>) Ligación**

Se realizó en un volumen total de 20 µl, que contenía 100 ng del vector; 50 mM Tris pH 7,6; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM ATP; 1 mM DTT; 1 unidad de la enzima T4 ligasa (GIBCO/BRL) y una cantidad variable del ADN fosforilado. La reacción se incubó a 37°C durante 30 min. y 12 horas a 22°C.

### **3.3.5.2. Preparación de células competentes.**



El método utilizado fue el descrito por Dower *et al.*, (1988). La cepa XL1-Blue MRF' de *E. coli* se inoculó en 4 ml de LB suplementado con 10 µg/ml de tetraciclina y se incubó a 37°C. de 10 a 12 horas. Transcurrido este tiempo, 1 ml del inóculo se transfirió a 200 ml de LB-tetraciclina y se mantuvo en agitación a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,6 a 600 nm. Una vez alcanzada esa densidad óptica, el cultivo se centrifugó 10 minutos a 4°C y a 4.500 x g. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se lavó dos veces con agua destilada previamente enfriada, cuyo nuevo sobrenadante se resuspendió cuidadosamente en cada lavado. Finalmente, las células se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron en glicerol al 10% y

se distribuyeron en alícuotas de 200 µl. Dichas alícuotas se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C.

#### 3.3.5.3. Transformación

Se mezclaron 5 µl del volumen de ligación con 200 µl de células electrocompetentes previamente descongeladas y se incubó 5 minutos en hielo. Posteriormente, las bacterias se electroporaron en cubetas de 0,1 cm, en un electroporador Gen Pulser II (Bio-Rad) a 1,8 Kv, 200Ω y 25 µF. Inmediatamente después, se añadió 1 ml de caldo LB y se mantuvo durante 1 hora en agitación a 37°C. Transcurrido este tiempo, las células se sembraron en medio LB sólido suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, 250 µg/mL X-Gal y 2,5 µg/ml de IPTG. Se incubaron durante 10-12 horas a 37 °C.

En los transformantes que contienen el inserto, se interrumpe la secuencia codificante del gen beta-galactosidasa. Dichos transformantes pueden ser identificados por el tipo de color de las colonias en las placas suplementadas con X-Gal como sustrato. Los clones con el inserto producen colonias blancas, y las que no, aparecen azules. Se seleccionaron las colonias blancas y se inocularon en LB-Ap a 37°C hasta llegar a la fase estacionaria de crecimiento.

#### 3.3.6. Extracción del ADN plasmídico

Se siguió el protocolo descrito por Sambrook *et al.*, (1989) con algunas modificaciones. Se partió de un cultivo de células en fase estacionaria crecidas en medio LB líquido suplementado con ampicilina. Se tomó 1,5 ml y se sedimentó en microcentrífuga a 15.110 x g durante 1 minuto. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 100 µL de solución I (50 mM de glucosa; 25 mM Tris HCL, pH 8 y 10 mM EDTA, pH 8). Tras agitar la muestra intensamente, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 200 µl de solución II (1% SDS y 0,2 M NaOH), se mezcló cuidadosamente y se incubó durante 5 minutos en hielo. Posteriormente, se añadieron 150 µl de solución III (5 M Acetato; 3 M de K<sup>+</sup>), se mezcló y se incubó en hielo. Para eliminar los restos celulares, se centrifugó durante 5 minutos a 15.110 x g y se recogió el sobrenadante. Después, se precipitó al añadir 1 ml de etanol absoluto y se dejó 15 minutos en hielo. Luego, se centrifugó 30 minutos y se lavó dos veces con 500 µl de etanol 70% (v/v). El ADN precipitado se secó y se resuspendió en 25 µl de TE suplementado con 20 ng/µl de ARNasa (Boehringer-Mannheim).

#### 3.3.7. Secuenciación del ADN y análisis de secuencias.

La secuenciación se llevó a cabo de dos maneras distintas:



### A) Secuenciación automática

Para la secuenciación de la  $\alpha$ -tubulina, se recurrió al servicio de secuenciación automática de Boehringer Mannheim (Valencia).

### B) Secuenciación manual

Se empleó el método “DIG Taq DNA Sequencing Kit” (Roche). Este método está basado en el de Sanger y fue desarrollado por Innis *et al.*, (1988). Se basa en el empleo de cebadores universales M13 y reverse, unidos en su extremo 5' a la digoxigenina. Su detección se logra utilizando un anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina.

#### B<sub>1</sub>) Reacción de secuenciación

Para llevar a cabo la reacción de secuenciación, se preparó una mezcla matriz en un volumen final de 20  $\mu$ l, que contenía lo siguiente: 1 pmol de ADN plasmídico; 1 pmol de cada cebador (2  $\mu$ l de M13/pUC o 2  $\mu$ L de M13/pUC reverse en cada caso según la dirección de polimerización); 100 mM Tris; 500 mM KCl y 15 mM  $MgCl_2$ , a pH 8 y 3 U de Taq ADN polimerasa. A continuación, se distribuyó la solución matriz en cuatro tubos y a cada uno se añadió una de las siguientes mezclas de terminación:



**Mezcla A:** dATP, dCTP; 7-deaza-dGTP; dTTP (a 25  $\mu$ M cada uno); 850  $\mu$ M ddATP y 950  $\mu$ M  $MgCl_2$ , pH 7,5.

**Mezcla G:** dATP, dCTP; 7-deaza-dGTP; dTTP (a 25  $\mu$ M cada uno); 850  $\mu$ M ddGTP y 950  $\mu$ M  $MgCl_2$ , pH 7,5.

**Mezcla C:** dATP, dCTP; 7-deaza-dGTP; dTTP (a 25  $\mu$ M cada uno); 850  $\mu$ M ddCTP y 950  $\mu$ M  $MgCl_2$ , pH 7,5.

**Mezcla T:** dATP, dCTP; 7-deaza-dGTP; dTTP (a 25  $\mu$ M cada uno); 850  $\mu$ M ddTTP y 950  $\mu$ M  $MgCl_2$ , pH 7,5.

Estas mezclas se incubaron a las temperaturas y tiempos siguientes:

94°C, 4 min. 60°C, 30 seg. 72°C, 1 min. 24 seg.		1 ciclo
94°C, 30 seg. 60°C, 30 seg. 72°C, 1 min. 24 seg.		24 ciclos

Al final de estos ciclos, la reacción se paró al añadir a cada tubo 2  $\mu$ l de una solución de formamida desionizada al 98% (v/v) en 10 mM EDTA, pH 8; 0,025% azul de bromofenol y 0,025% xilen cyanol FF.



### **B<sub>2</sub>) Electroforesis del ADN obtenido en la reacción de secuenciación**

Para la electroforesis del ADN, se siguió el sistema de electroforesis y transferencia directa, DBE (GATC-1500, MWG, Roche). En este sistema, los fragmentos de ADN se separan y transfieren directamente a una membrana de nylon en movimiento. Tras la reacción de secuenciación, se cargó una alícuota en un gel de poliacrilamida (solución 19:1 acrilamida:bisacrilamida) al 4% y 8 M de urea en tampón TBE. Por último, el ADN se fijó a la membrana mediante luz ultravioleta.

### **B<sub>3</sub>) Detección**

Para la detección, se empleó el método colorimétrico desarrollado por Holtke et al., (1990). La membrana se incubó durante 1 hora a 30°C en tampón maleico y 1% de reactivo de bloqueo (Roche). Posteriormente, se añadió el anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche) en una dilución de 5000:1 en la solución arriba indicada y se incubó durante 45 min. Transcurrido este tiempo, se procedió a la eliminación del exceso de anticuerpo con tampón maleico y Tween 20 al 1% (v/v) lavando la muestra primero dos veces durante 5 minutos y luego dos veces más durante 15 minutos. Por último, por cada 25 ml de tampón de revelado se añadieron 68 µL de una solución 100 mg/ml de nitrobluetetrazolium (NBT) y 90 µl de una solución 50 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP).

Descripción de los tampones utilizados:

#### **Tampón maleico**

10 mM Ácido maleico.  
150 mM Cloruro sódico.  
pH 7,5.

#### **Tampón de revelado**

100 mM Tris.  
100 mM Cloruro sódico  
50mM Cloruro de magnesio.  
pH 9,5.

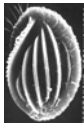
### **3.3.8. La construcción de árboles filogenéticos**



Las secuencias de nucleótidos para el ARNr28S y la tubulina empleados en los estudios comparativos se muestran en la tabla siguiente, junto con los números de acceso de la base de datos GenBank para las diferentes secuencias de nucleótidos:

	Nº de acceso para $\alpha$ -tubulina	Nº de acceso para ARNr 28S
<i>Phacodinium metchnikoffi</i>	AY554040	AY554041
<i>Euplotes vannus</i>	Z11769	
<i>Euplotes octocarinatus</i>	X69466	
<i>Euplotes aediculatus</i>	Z49851	M98383
<i>Uronychia transfuga</i>		AF 260120
<i>Urostyla sp</i>		M98388
<i>Histriculus cavicola</i>	Y10035	
<i>Stylonychia lemnae1</i>	X01746	M98381
<i>Stylonychia lemnae2</i>	X12365	
<i>Oxytricha granulifera</i>	Z11763	
<i>Spirostomum sp</i>	AF003251	
<i>Frontonia sp</i>	AJ224897	
<i>Paramecium tetraurelia1</i>	X99489	
<i>Paramecium tetraurelia2</i>	X99490	
<i>Blepharisma japonicum</i>	AF003250	M19221
<i>Stentor coeruleus</i>	Z49853	M19220
<i>Eufolliculina uhligi</i>		
<i>Condyllostoma magnum</i>	Z49850	Z49906
<i>Loxodes striatus</i>	Z49852	M98368
<i>Entodinium sp</i>	Z49849	Z49857
<i>Epidinium sp</i>	Z49856	Z49914
<i>Enchelys pelucida</i>		M98375
<i>Isotricha prostoma</i>		
<i>Colpoda sp</i>	X94348	Z49105
<i>Spathidium amphoriforme</i>	Z49848	Z49854
<i>Zosterograptus sp</i>	Z49855	Z49904
<i>Tetrahymena termophila</i>	M86723	X54512
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	X12767	X54004

**Nota:** Algunos números de registro no aparecen porque fueron cedidas por A. Baroin o no se han utilizado en el árbol respectivo.



### 3.3.9. Tratamiento informático en la construcción de árboles filogenéticos

Para obtener la filogenia de las especies comparadas, los árboles diseñados con los dos marcadores en estudio, ARNr 28S y tubulina, se realizaron con el programa “njplot” para Macintosh desarrollado por M. Gouy (URA 243 CNRS, Universidad Claude Bernard, Lyon).

#### A) Para el ARNr 28S

Se empleó el paquete de programas PHYLIP (versión 3.5; Felsenstein (1993), Departamento de Genética de la Universidad de Washington) para el análisis de las secuencias.

Los árboles de distancia filogenética se construyeron mediante los tres métodos clásicos:

- El método “neighbor-joining” de Saitou y Nei (1987), basado en una matriz de distancias (% divergencia/100) entre todas las secuencias comparadas por parejas.

- El análisis de parsimonia, que se realizó con el programa PROTPARS del paquete PHYLIP.

- El análisis de “maximum likelihood”, para el que se utilizó el programa fADNml de G.J. Olsen (Universidad de Illinois).

La evaluación de la validez estadística de los nodos se llevó a cabo utilizando el procedimiento de “bootstrap” sobre 1.000 con el programa NJBOOT del paquete MUST (Philippe, 1993).

#### B) Para la $\alpha$ -tubulina

A partir de las secuencias utilizadas en los estudios comparativos, se construyó un árbol filogenético eliminando los 14 primeros aminoácidos de la región amino-terminal, por ser ésta la zona más divergente de la molécula.

Las secuencias de ADN obtenidas se sometieron a un análisis informático mediante el paquete del “Genetics Computer Group” (programa GCG) de la Universidad de Wisconsin (Devereux *et al.*, 1984).

Los comandos GCG utilizados fueron éstos:

- “Bestfit”: para obtener los emparejamientos y los porcentajes de similitud e identidad entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos.

- “ClustalW”: para el alineamiento de secuencias de nucleótidos o aminoácidos.

## **IV. RESULTADOS**

---



## 4.1. LA CÉLULA VEGETATIVA

### 4.1.1. Morfología general

*Phacodinium metchnikoffi* es incoloro, tanto en estado vegetativo como quístico. La célula es aplanada lateralmente, de forma que el perfil donde se sitúa la zona adoral de membranelas corresponde al lado ventral, la cual se origina en el polo anterior del lado izquierdo y se torsiona hasta entrar en el embudo bucal situado en el polo posterior del lado derecho (figs. 22-25).

En su aspecto general se distingue una zona anterior y otra posterior:

- El área anterior es más ancha, de forma que el lado derecho sobresale en esta zona por encima del lado izquierdo (figs. 22-24).
- El área posterior presenta, en la mayoría de los individuos, una parte más aguzada donde se observa una gran vacuola pulsátil.

La tabla II muestra la caracterización biométrica de la especie después de la fijación con formaldehído:

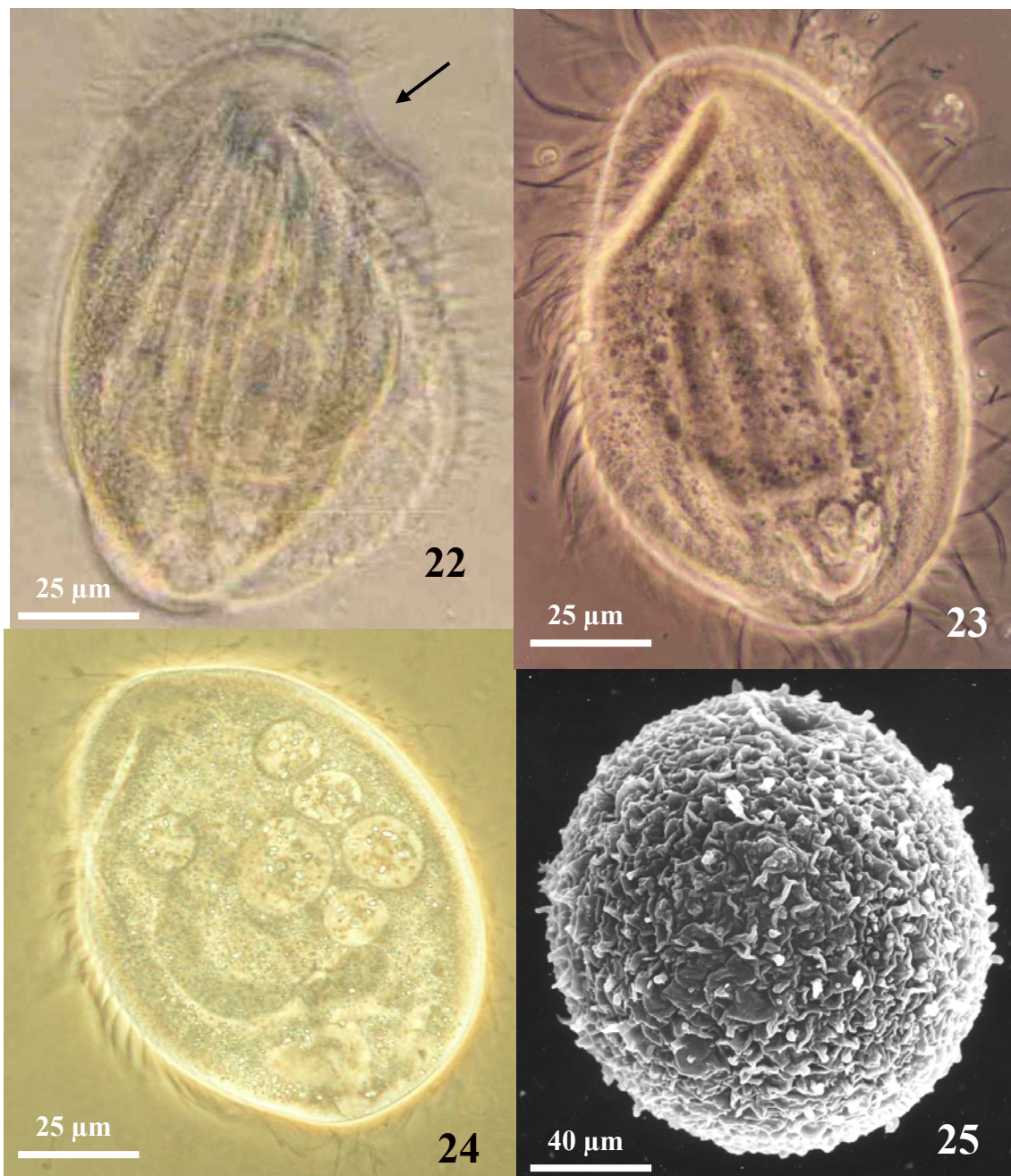
Carácter ( $\mu\text{m}$ )	Mín.	Máx.	$\bar{x}$	Md	Se	$S_x$	CV	n
Longitud total	109,06	234,51	135,85	139,65	35,22	2,70	8,99	30
Anchura máxima	66,50	195,76	82,77	83,79	2,73	1,03	5,25	30
Anchura polo anterior	39,90	69,16	59,72	61,18	1,89	1,15	3,93	30
Anchura polo posterior	55,22	93,84	66,13	55,86	1,41	1,05	3,87	30
Longitud ZAM	85,43	124,45	114,45	112	22,13	1,76	4,22	30
Nº paramembranelas	43	65	50	50	8,79	1,2	3,22	30
Anchura macronúcleo	55,25	112,30	87,22	75	3,25	1,25	3,4	30
Nº micronúcleos	2	6	4	4	0	0	0	30
Número de "paletas"	12	20	16	15	2,35	1,2	2,1	30
Número de cinetias	9	6	7	8	0,5	2,15	1,3	30

**Abreviaturas:** Mín, mínimo; Máx, máximo;  $\bar{x}$ , media; Md, mediana; Se, error estándar;  $S_x$ , error estándar de la media; CV, coeficiente de variación; n, tamaño de la muestra.

**Tabla II.** Medidas morfométricas en individuos vegetativos de *P. metchnikoffi* impregnados con carbonato de plata.

La posibilidad de que dentro de la denominación de *Phacodinium metchnikoffi*, se confundan varias especies fue planteada ya por Dragesco y Dragesco-Kernéis (1986) y por Iftode y Fryd-Versavel (comunicación personal). Sin embargo, la diversidad morfológica (Calvo, 1989) y la variación morfométrica parecen sólo corresponder a estadios del ciclo vital o a la variación de las condiciones ambientales.

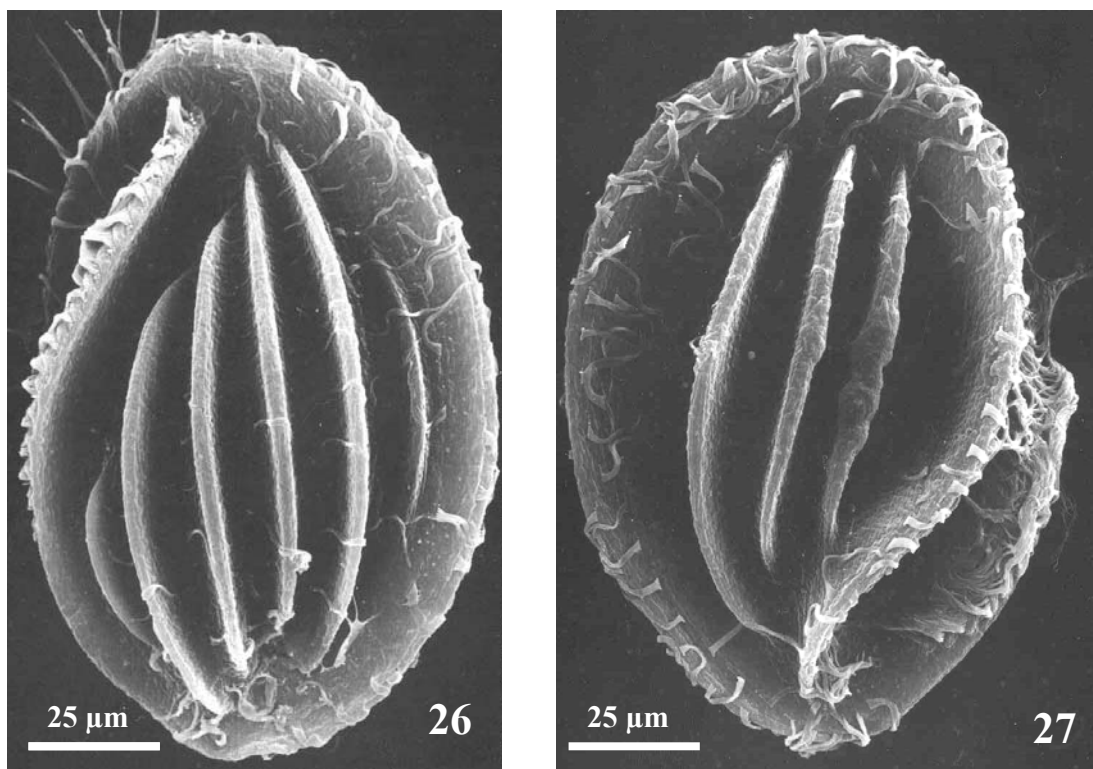




**Figs. 22-24.** Morfología “in vivo” con microscopia de contraste de fases. **22.** La flecha señala una pequeña escotadura anterior. **Fig. 25.** MEB. Estadio quístico.



En las imágenes “in vivo”, con contraste de fases (figs. 22-24), es posible observar la morfología general de la célula y algunos orgánulos citoplasmáticos: numerosas vacuolas digestivas, una gran vacuola pulsátil terminal y numerosos gránulos corticales. El macronúcleo presenta forma de herradura (fig. 24). Algunos individuos presentan una escotadura en el extremo anterior (fig. 22).

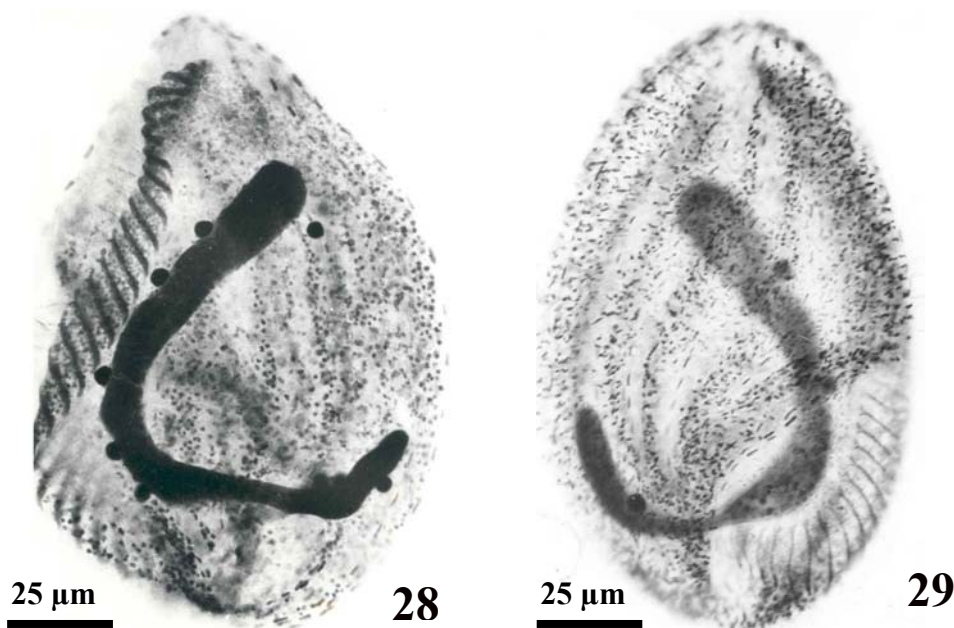


**Figs. 26 y 27.** MEB. **26.** Lado izquierdo: se observan 6 crestas corticales. **27.** Lado derecho: se observan tres crestas y el embudo bucal.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido determinan que la superficie celular está decorada por una serie de costillas o crestas longitudinales situadas en ambos lados de la célula, cuyo número es mayor siempre en el lado dorsal (promedio de 6/4 respectivamente) (figs. 26 y 27). Las cinetias somáticas se sitúan entre las crestas corticales.

#### **4.1.2. Resultados en individuos impregnados**

En el citoplasma de los ejemplares teñidos destacan numerosos gránulos argirófilos, correspondientes a mucocistos, que se concentran en las franjas que definen las crestas corticales (figs. 28 y 29). Además, se observan tricocistos, fundamentalmente en las fases prequísticas, como ocurre en otros hipotricos.



**Figs. 28 y 29.** Morfología general del lado izquierdo y del lado derecho con tinción argéntica. Se aprecian el macronúcleo y 7 micronúcleos, así como las paramembranelas de la ZAM en la zona ventral. Los mucocistos subcorticales forman hileras situadas por debajo de las crestas

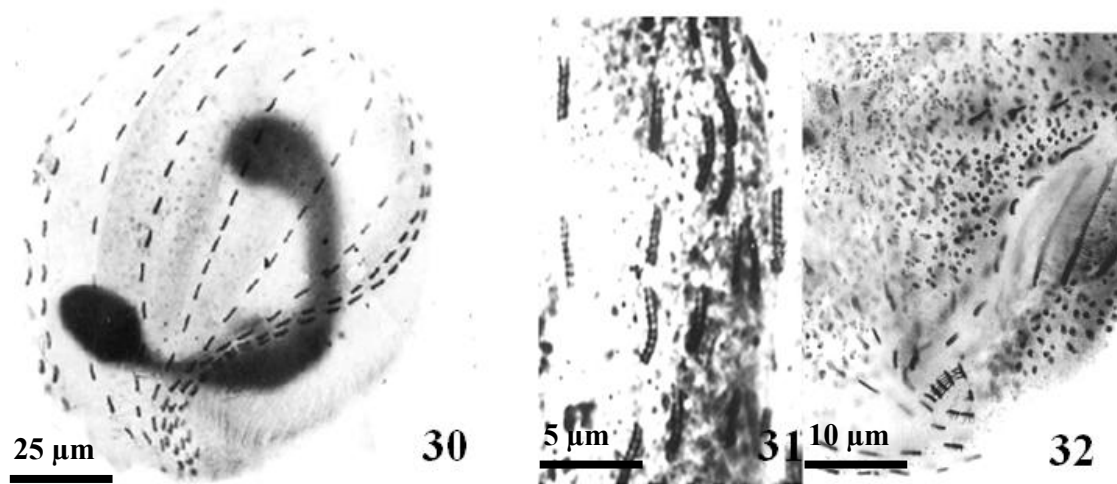
La dotación nuclear está compuesta por un macronúcleo con forma de herradura y una media de 4-5 micronúcleos elipsoidales o lenticulares. Estos últimos se localizan, generalmente, en depresiones del macronúcleo, al igual que en otros muchos ciliados (fig. 28). En algunos estadios del ciclo vital, en los extremos y en el centro aparecen unas dilataciones que pudieran ser zonas de reorganización.

En los valles que forman las crestas, se sitúan las hileras longitudinales de cilios somáticos. Destacan, por la disposición de los cinetosomas somáticos en “paletas” (Didier y Dragesco, 1979), “pestañas” (Kahl, 1935) o policinétidas (Lynn y Small, 2000), formadas por grupos de 9 a 11 cinetosomas. Las cinetias se disponen oblicuamente con respecto al eje longitudinal de la célula (fig. 30). Nuestras observaciones indican que en el extremo posterior de la célula, las hileras más próximas al embudo bucal se componen de polidicinétidas (figs. 31 y 32).

En el lado derecho, cada hilera consta de 12-15 policinétidas (“paletas”) en las cinetias centrales, pero pueden llegar hasta 20 en las cinetias marginales.

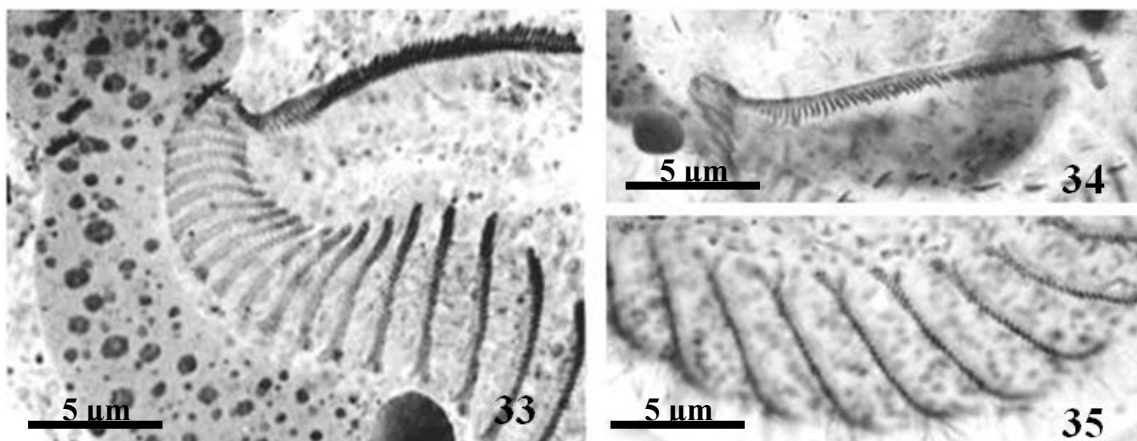
En el lado izquierdo, el número de hileras se reduce a 5-6 y el área más cercana a la ZAM presenta “paletas” con sólo uno o dos cinetosomas no ciliados (figs. 72 y 74).

Todos los cinetosomas somáticos presentan fibras cinetodésmicas que son más largas y marcadas por debajo de la ZAM en el polo posterior (fig. 32).



**Fig. 30.** Célula vegetativa teñida con carbonato de plata, donde se observan las “paletas” somáticas dispuestas en hileras y el macronúcleo. **Fig. 31.** “Paletas” formadas por dobles hileras de cinetosomas que se sitúan en el reborde posterior del citostoma. **Fig. 32.** “Paletas” posteriores con fibras cinetodésmicas más desarrolladas.

La ciliación bucal está compuesta por una zona adoral de membranelas (ZAM) y un complejo paroral en el lado derecho de la cavidad bucal (figs. 33-35). La ZAM nace en la parte anterior del lado izquierdo y se dirige por el borde ventral para llegar al lado derecho, en su polo posterior, entrando en el embudo bucal (figs. 28 y 29).



**Fig. 33.** ZAM y complejo paroral. Se observan las paramembranelas posteriores con cuatro filas de distinta longitud pero completamente paralelas. **Fig. 34.** Detalle de la formación paroral con numerosas, aunque cortas, filas de cinetosomas apoyadas en un “soporte” proteico. **Fig. 35.** Detalle de las paramembranelas anteriores con cuatro filas de cinetosomas con un pequeño desplazamiento de algunos cinetosomas de la cuarta fila.



#### 4.1.3. Resultados en inmunofluorescencia indirecta

Se han caracterizado los sistemas microtubulares, tanto corticales como citoplasmáticos, y los relacionados con la ciliación somática y oral. Asimismo, se ha determinado qué fracción de los microtúbulos de *Phacodinium metchnikoffi* se encuentra modificada postraduccionalmente.

##### 4.1.3.1. Redes microtubulares

La superficie cortical de *P. metchnikoffi* se encuentra reforzada por una densa red cortical de microtúbulos longitudinales poliglutamilados, como se pone de manifiesto por la intensa tinción con el anticuerpo GT335, tanto en el lado derecho como en el lado izquierdo de la célula (figs. 45, 46 y 52). Anticuerpos generales, como el TEU 435, revelan la existencia de haces discontinuos de microtúbulos longitudinales (figs. 36 y 41), que constituyen una subpoblación de microtúbulos acetilados (TEU 318, 348) (figs. 53, 55 y 56). Esta última subpoblación de microtúbulos parece originarse a partir de la infraciliación somática, probablemente a partir de las fibras postciliares (figs. 40, 41, 53 y 55).

Este ciliado presenta, además, una red intracitoplásmica de microtúbulos profusamente interconectados entre sí, que se tiñe intensamente con los anticuerpos TEU 435 (figs. 37, 38, 39 y 43), TAP 952 (figs. 66, 69, 70 y 71) y GT335 (figs. 49, 50 y 51), es decir, este componente dinámico del citoesqueleto está constituido por microtúbulos glutamilados y monoglicilados. El anticuerpo TEU 435 revela que esta compleja y densa red de microtúbulos en el citoplasma está conectada con las estructuras infraciliares orales (ZAM y complejo paroral) (figs. 37, 38 y 39) y probablemente también con los microtúbulos que rodean el macronúcleo (fig. 39). El anticuerpo TEU 348, característico de microtúbulos estables acetilados, tiñe débilmente esta red interna (figs. 56, 58 y 60).

Algunos anticuerpos (TAP 952, TEU 348, TEU 435) ponen de manifiesto una red microtubular en la periferia del macronúcleo (fig. 69: TAP 952; fig. 58: TEU 348; figs. 37 y 39: TEU 435) que parece estar acetilada y monoglicilada.

Cuando se emplearon los anticuerpos dirigidos frente a tubulina tirosilada (1A2 y YL 1/2), no se observó ninguna reacción, por lo que se deduce que los microtúbulos de *P. metchnikoffi* no contienen tubulina tirosilada en proporción detectable (resultados no mostrados).

##### 4.1.3.2. Ciliación e infraciliación

Tanto axonemas ciliares como cinetosomas son sistemas microtubulares muy estables que se ponen de manifiesto con todos los anticuerpos anti-tubulina ensayados.

El anticuerpo AXO 49 decora ambas estructuras con una fuerte intensidad de fluorescencia (figs. 72-75), por lo que la poliglicilación es una modificación postransduccional que se produce exclusivamente en este ciliado en la tubulina axonemal y cinetosómica. Este anticuerpo permite poner de manifiesto la presencia de algunos cinetosomas no ciliados en el margen izquierdo de la ZAM (figs. 72 y 74).





Por otra parte, el TAP 952, también dirigido contra proteína axonemal pero monoglicilada, decora intensamente los cinetosomas de la zona oral (ZAM y complejo paroral) (fig. 76). Este anticuerpo pone de manifiesto la presencia de haces microtubulares asociados a la base de las paramembranas: en el lado izquierdo, estos haces se dirigen hacia la parte posterior, mientras que, en el lado derecho, se dirigen lateralmente (TEU 435). Por último, se observan teñidos la fibra postoral (también se tiñe más débilmente con CTR210 y TEU 435) y otros sistemas no asociados a la ciliación, como se explicó anteriormente.

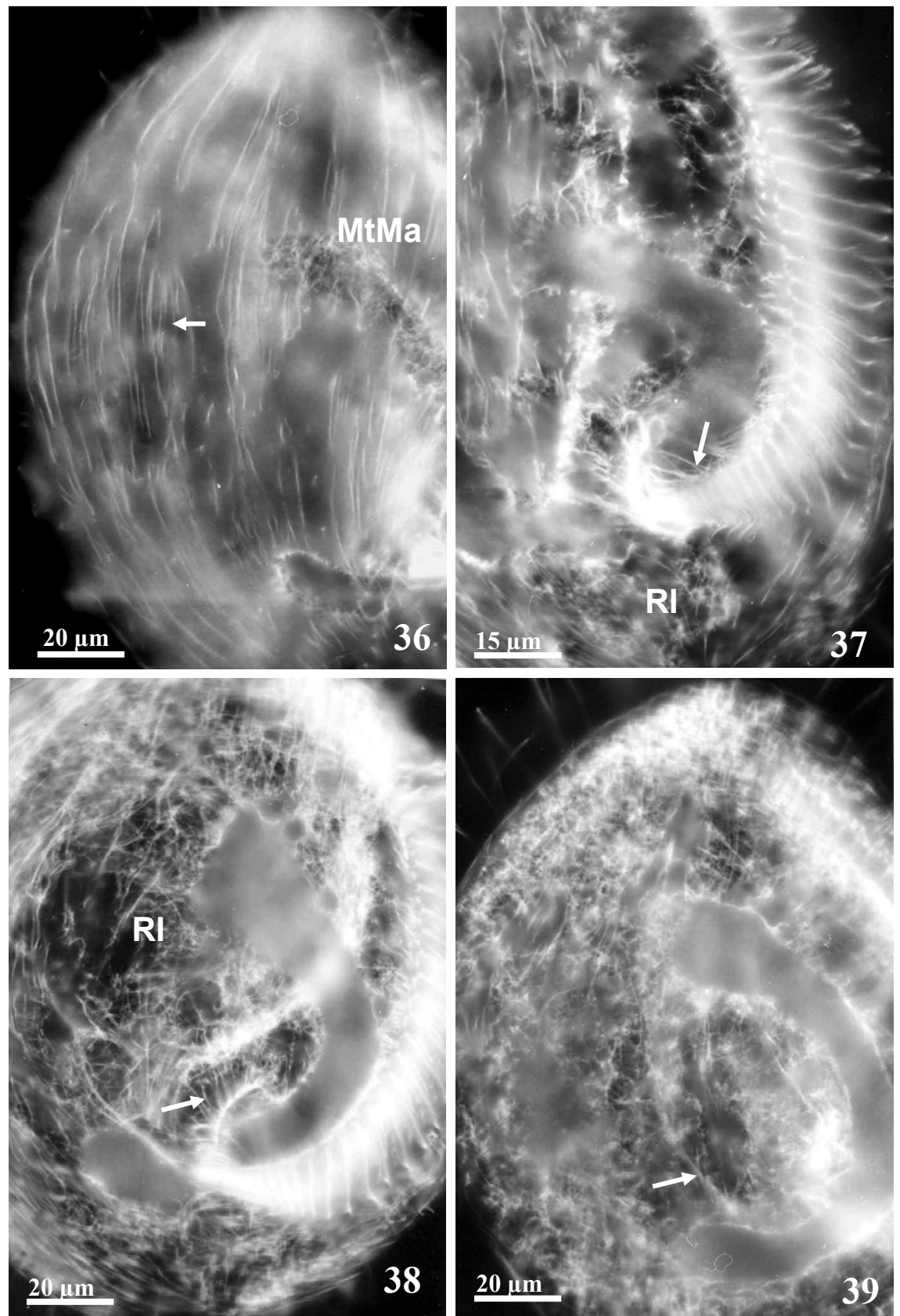
Los microtúbulos axonemales están también poliglutamilados y acetilados, como revela la tinción con los anticuerpos GT335 y TEU 318-348. Por lo tanto, las estructuras compuestas por cilios, como son las cinetias, así como los axonemas y cinetosomas de la zona adoral de membranas resultaron teñidos con estos anticuerpos. Cuando se utilizan anticuerpos frente a microtúbulos acetilados (figs. 53, 54 y 58), las fotografías muestran una mayor intensidad de fluorescencia en la región distal del axonema ciliar que en la basal.

Las fibras cinetodésmicas asociadas a los cinetosomas de las “paletas” somáticas se tiñeron con gran intensidad con el anticuerpo dirigido contra fibras cinetodésmicas de *Paramecium* (figs. 76-79). Cada uno de los cinetosomas que forman las policinetidas somáticas simples presenta una fibra cinetodésmica, corta y rígida, excepto los cinetosomas de las “paletas” próximas a la zona posterior del embudo bucal con una fibra cinetodésmica cuyo desarrollo es mayor.

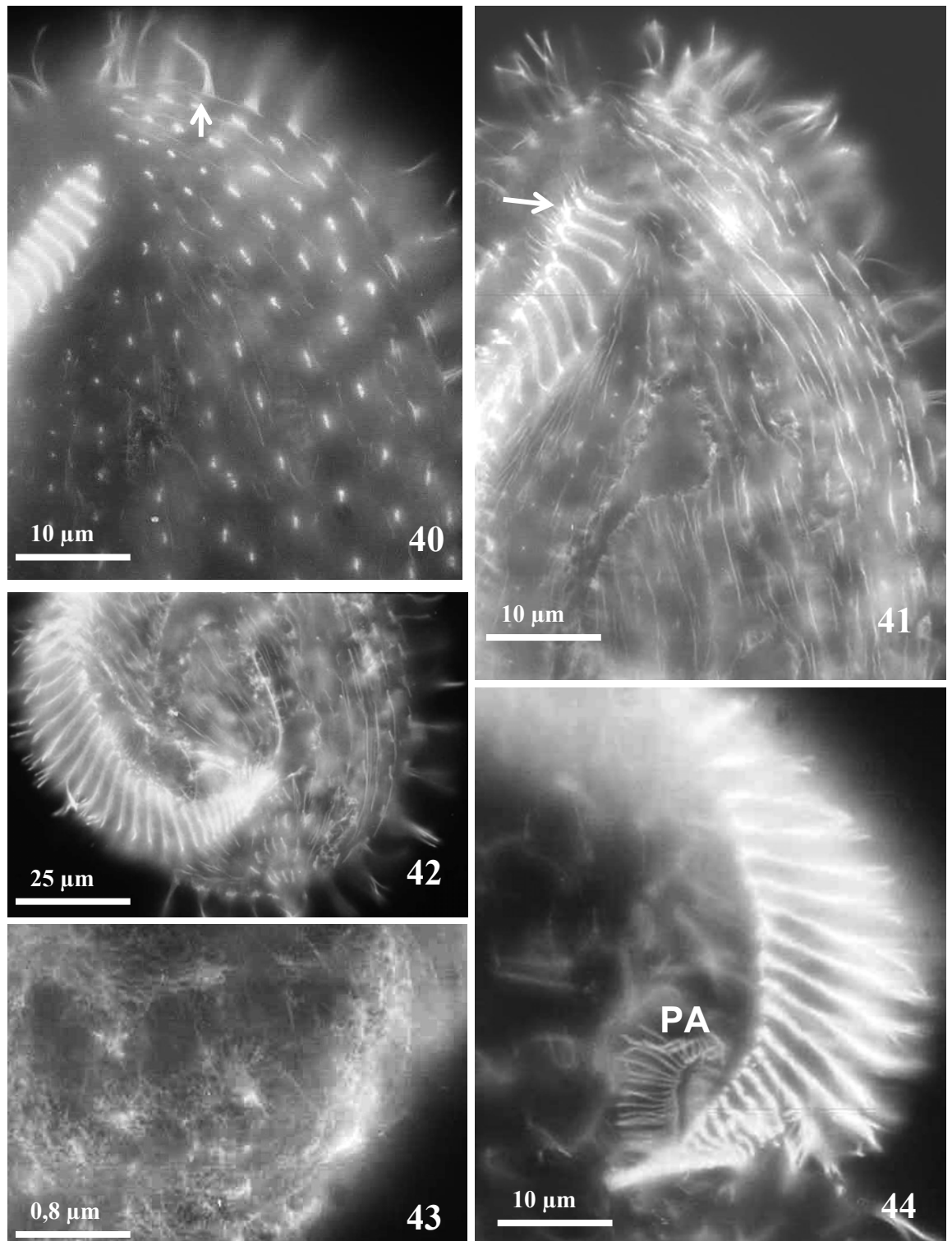
La siguiente tabla resume las estructuras citoesqueléticas marcadas por los distintos anticuerpos.

	CS	RS	RI	FM	AC	EP	KD	PN	FP
TEU 435	+	+	++	+	+	-	-	+	+
TAP 952	+	++	++	++	+	-	-	-	+
TEU 348	+	++	++	+	+	-	-	+	+
TEU 318	+	++	++	-	+	-	-	-	-
AXO 49	++	-	-	-	++	-	+	-	-
CTR210	++	-	-	-	-	-	-	-	-
GT 335	++	++	+	+	+	-	-	-	-
AntiKD	++	-	-	-	++	-	+	-	-
Epi 33	-	-	+	-	-	+	-	-	-

**Tabla III.** Anticuerpos anti-tubulina utilizados. CS, cinetosomas; RS, redes superficiales; RI, red interna; FM, fibras microtubulares asociadas a los cinetosomas; AC, axonemas ciliares; EP, epiplasma; Kd, fibra cinetodésmica; PN, perinuclear; FP, fibra postoral.

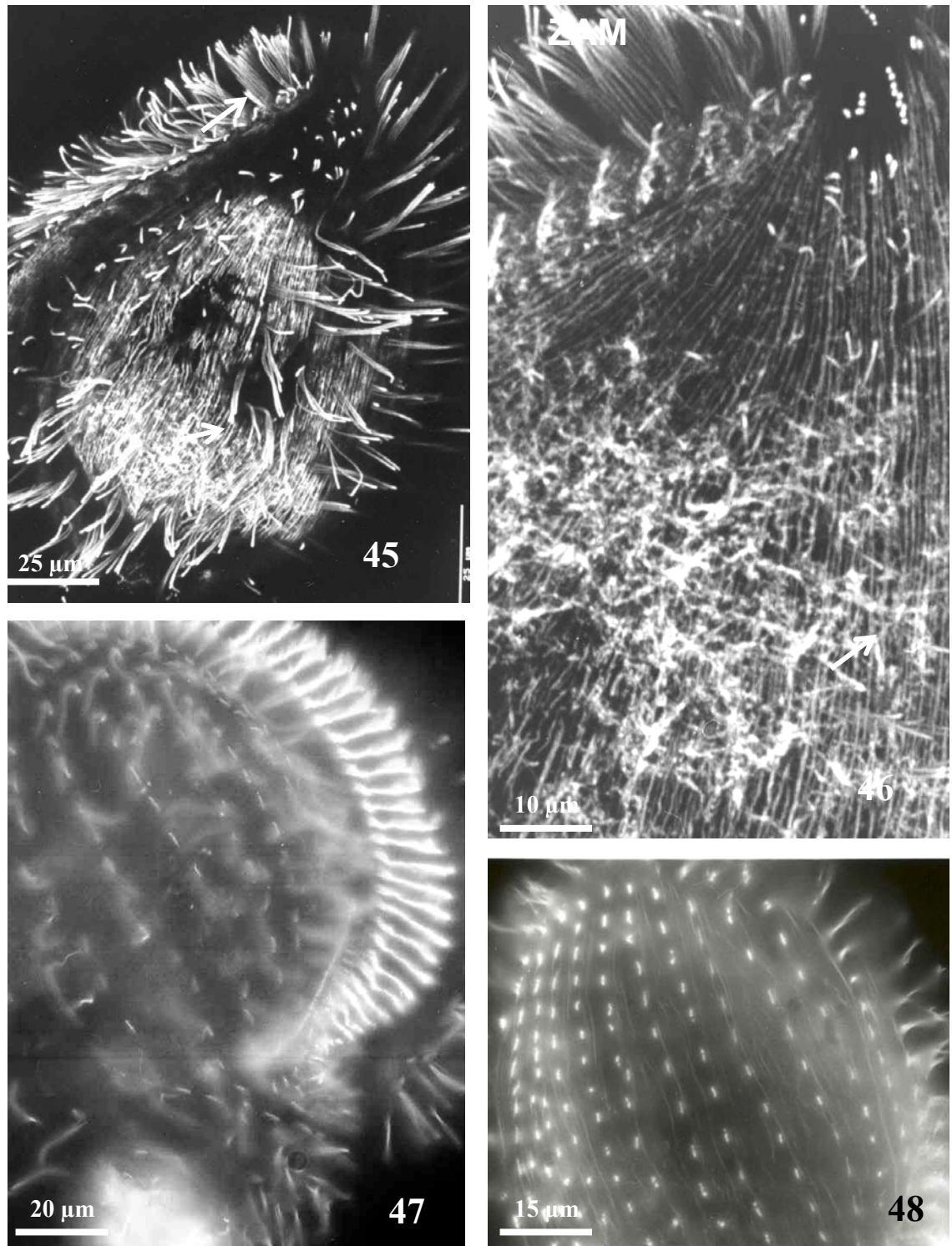


**Figs. 36-39.** Anticuerpo anti-tubulina TEU 435 (microscopía confocal). **36.** Lado izquierdo: se observan haces de microtúbulos longitudinales asociados a la ciliación somática (flecha) y microtúbulos perimacronucleares (MtMa). **37.** Lado derecho: ZAM con sistemas microtubulares asociados (flecha) y red intracitoplásmica. **38-39.** Red intracitoplásmica (RI) y microtúbulos perimacronucleares. La flecha indica la presencia de haces de microtúbulos que conectan la paroral con el macronúcleo.

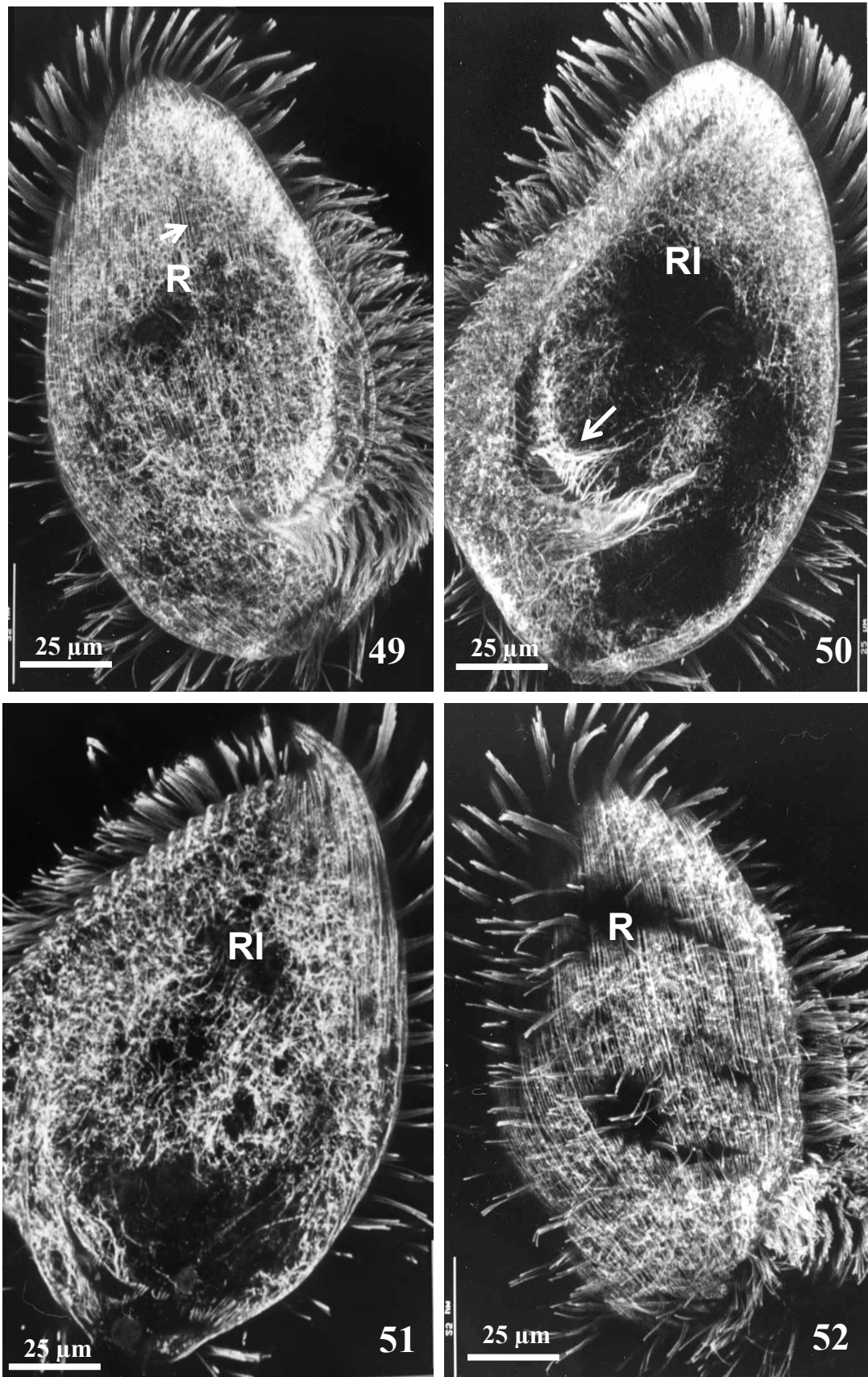


**Figs. 40-44.** Anticuerpo anti-tubulina TEU 435 (microscopía confocal). **40.** Infraciliación somática: la flecha señala los haces de microtúbulos que derivan de las policinétidas. **41.** Lado izquierdo: microtúbulos corticales y perimacronucleares. Se observan haces de microtúbulos que parten del lado derecho e izquierdo de las paramembranelas (flecha). **42.** Detalle de la fibra postoral. **43.** Detalle de parte posterior: la infraciliación somática parece estar conectada, a través de microtúbulos, con la red intracitoplasmática. **44.** Detalle de la zona posterior de la cavidad oral. PA: complejo paroral.

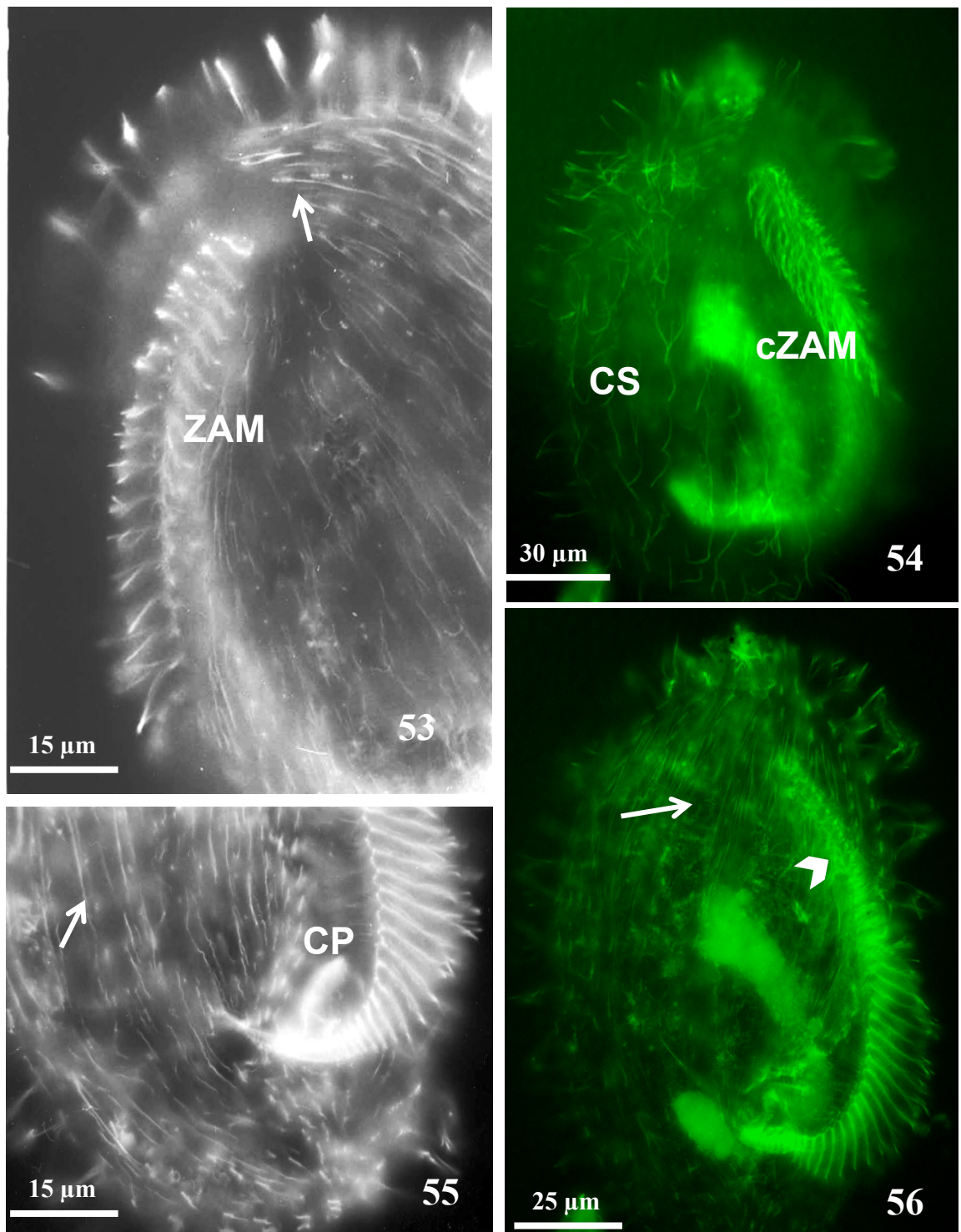




**Figs. 45-48.** Anticuerpo anti-tubulina glutamilada GT335 (microscopía confocal). **45.** Lado izquierdo: se observa la notable red de microtúbulos longitudinales corticales. **46.** Detalle de la zona superior izquierda. **47.** Lado derecho: se observan las bases infraciliares de la ZAM y de las “paletas” somáticas. **48.** Lado izquierdo: infraciliación somática y haces longitudinales de microtúbulos asociados a ella.



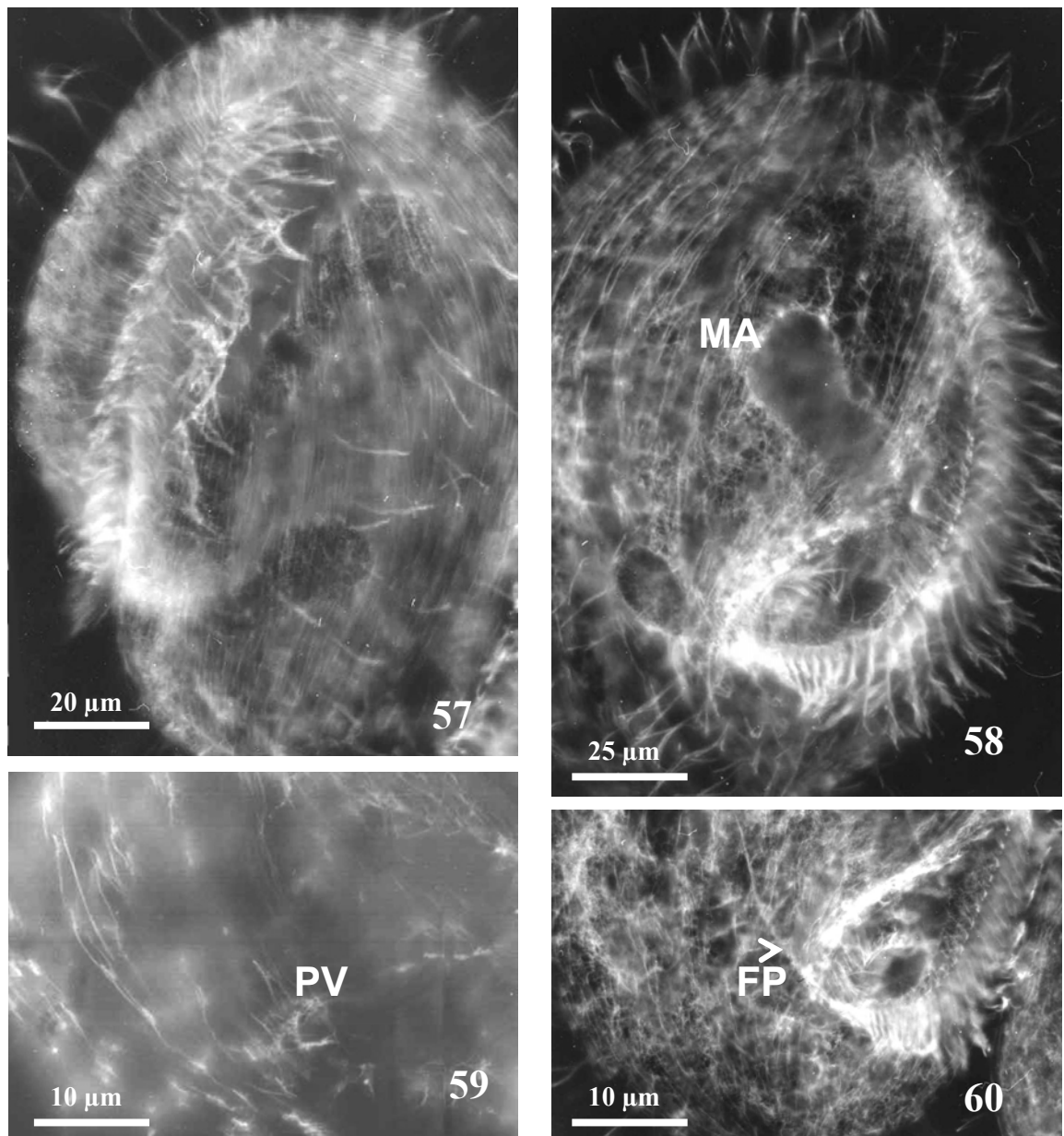
**Figs. 49-52.** Anticuerpo anti-tubulina glutamilada GT335 (microscopía confocal). Imágenes seriadas de las redes microtubulares reveladas gracias al anticuerpo: desde una densa red superficial longitudinal (RL) a las redes intracitoplásmicas (RI). Obsérvese la tinción de los cilios del complejo paroral (flecha en la fig. 50).



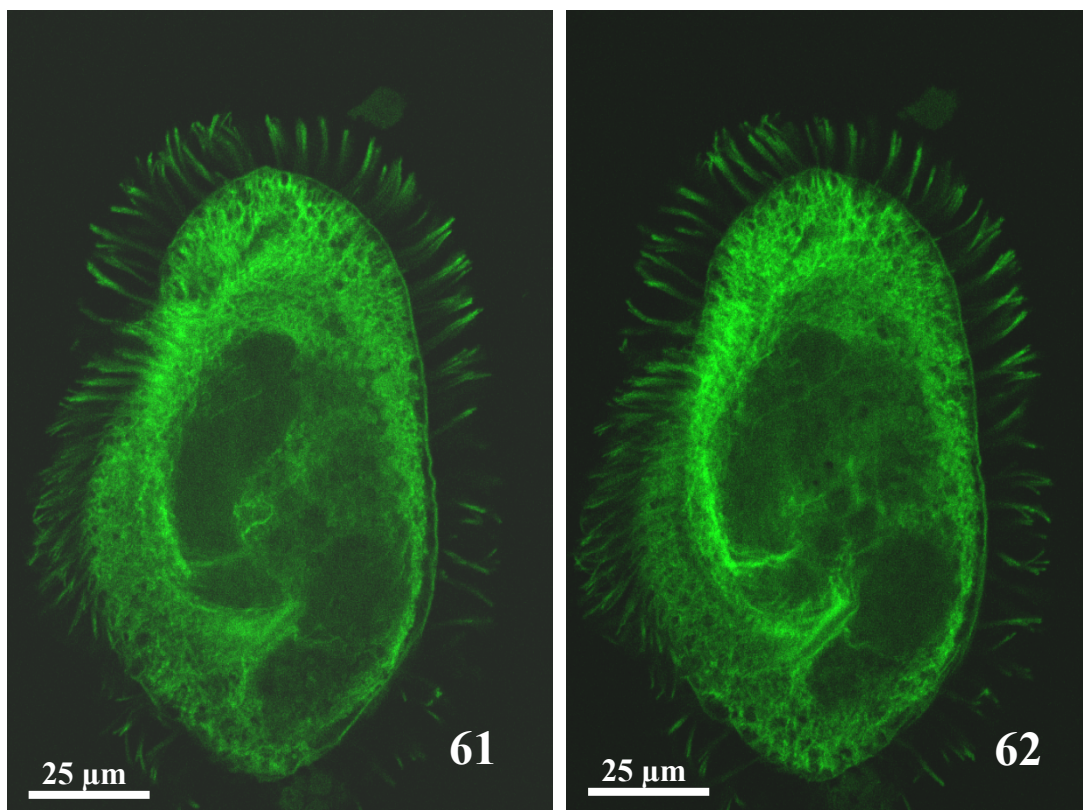
**Figs. 53-56.** Anticuerpo anti-tubulina acetilada TEU 348 (inmunofluorescencia indirecta). Tinción de conjuntos de microtúbulos estables: microtúbulos axonemales (ciliación e infraciliación) y microtúbulos corticales longitudinales asociados a la infraciliación (flecha). **56.** Obsérvese la presencia de microtúbulos asociados a la base de la ZAM (punta de flecha).

ZAM: zona adoral de membranelas; ZAMc: ciliación de la zona adoral de membranelas; CP: complejo paroral; CS: ciliación somática.

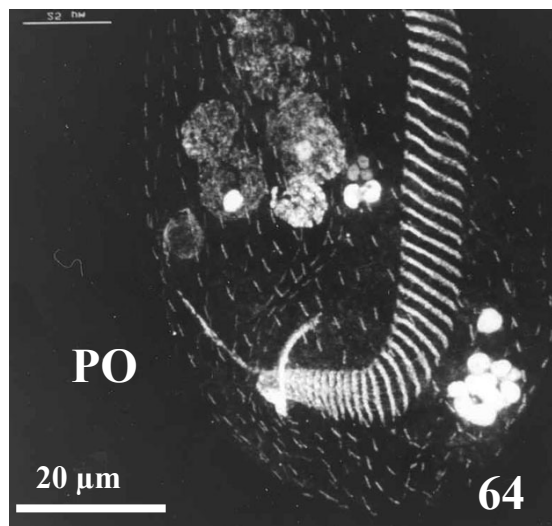
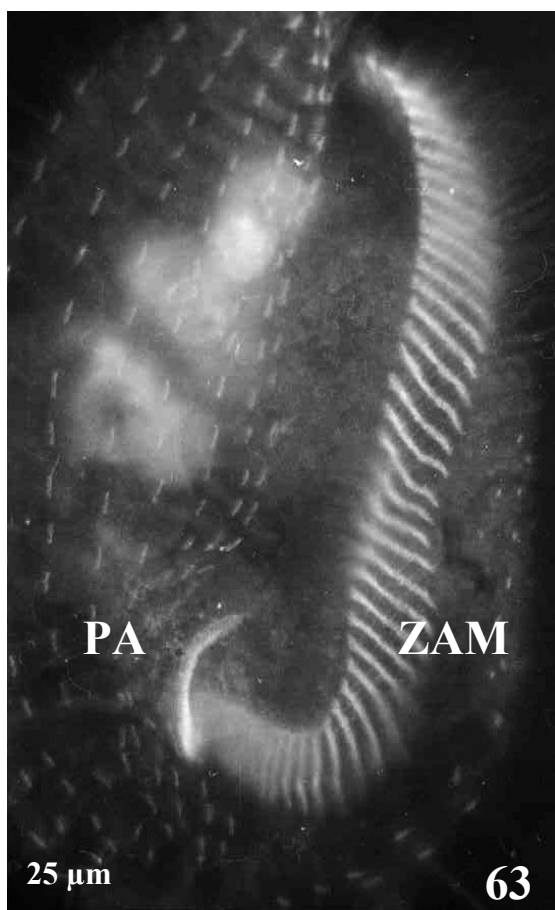




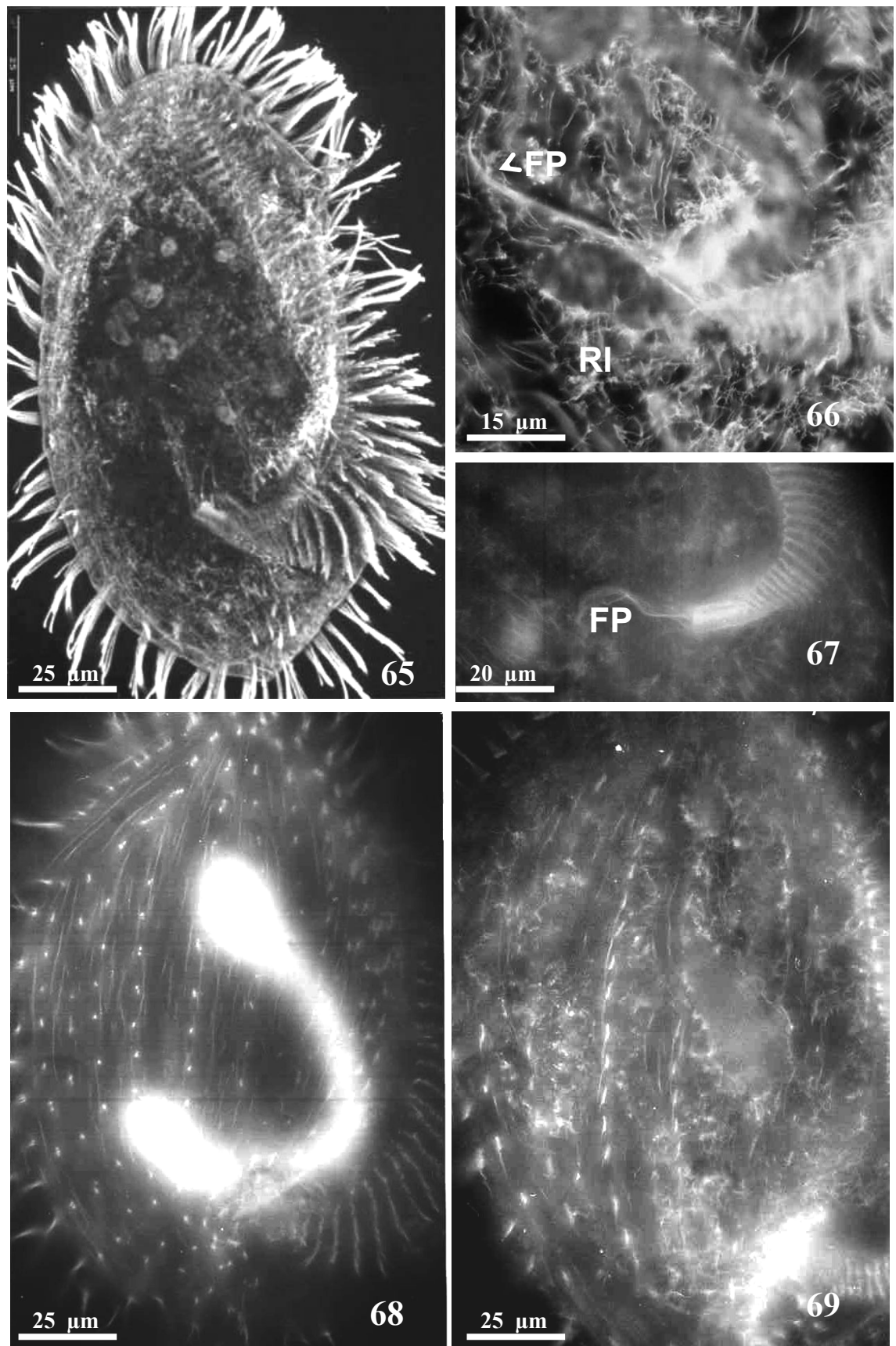
**Figs. 57-60.** Anticuerpo anti-tubulina acetilada TEU 348 (inmunofluorescencia indirecta). Tinción de poblaciones microtubulares estables y dinámicas. Se observa la tinción de la fibra postoral (FP), microtúbulos asociados al poro vacuolar (PV) y al macronúcleo (MA).



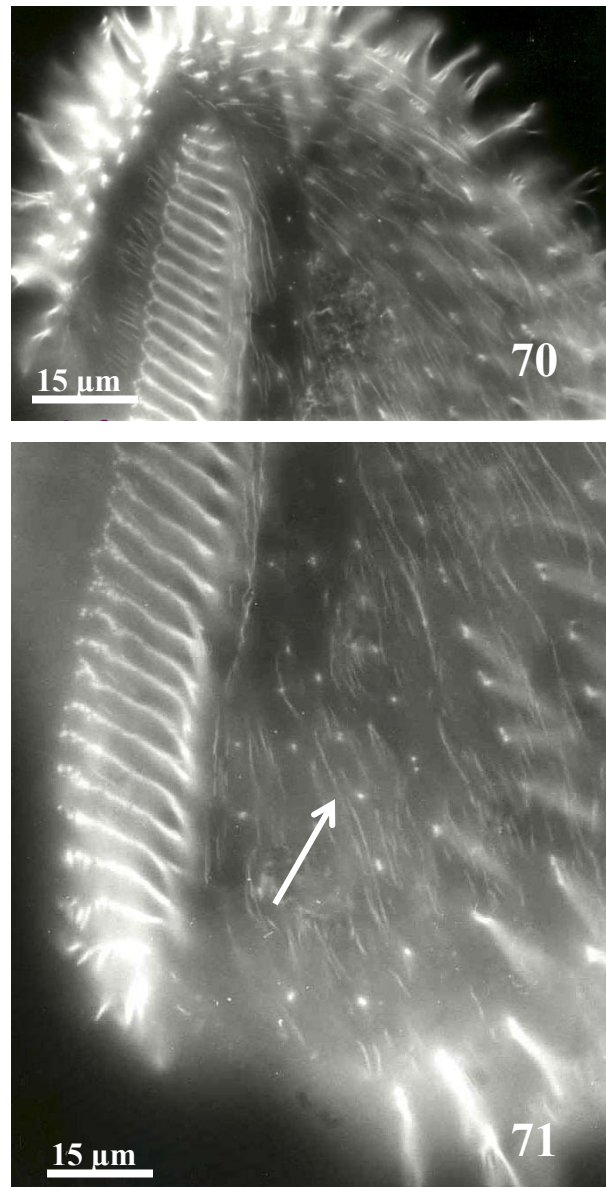
**Figs. 61-62.** Anticuerpo anti-tubulina acetilada TEU 318 (inmunofluorescencia indirecta). Tinción de poblaciones microtubulares estables y dinámicas.



**Figs. 63-64.** Anticuerpo anti-tubulina centrosomal CTR210 (inmunofluorescencia indirecta). Detalle de la infraciliación somática y oral en el lado derecho de la célula.  
PA: complejo paroral; ZAM: zona adoral de membranelas; PO: fibra postoral.

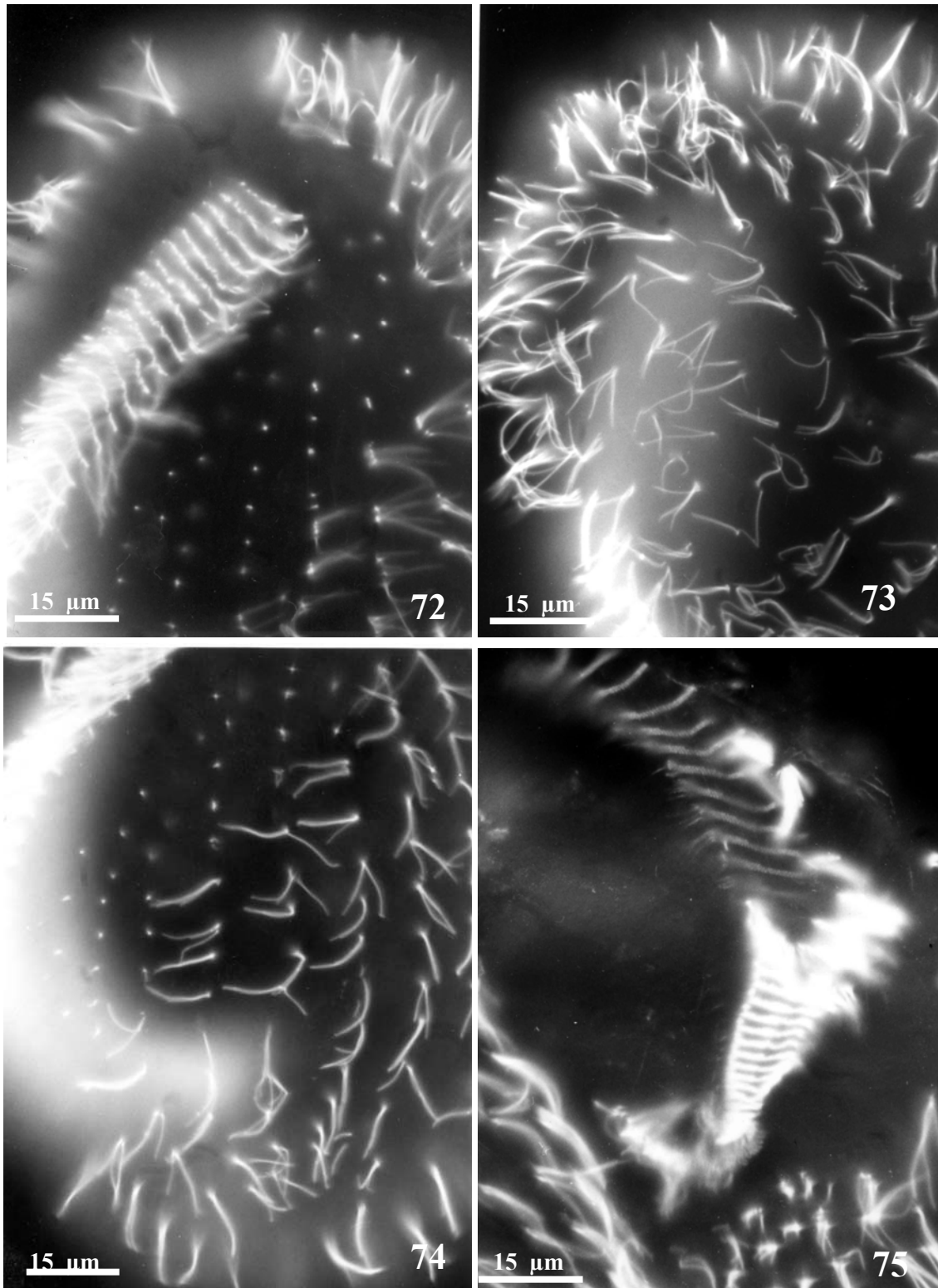


**Figs. 65-69.** Anticuerpo anti-tubulina monoglicidada TAP 952 (microscopía confocal). **65-66.** Aspecto general del lado derecho de la célula. Tinción de la ciliación somática y oral. **66.** Detalle de la red intracitoplásmica (RI). **67.** Detalle de la fibra postoral (FP). **68-69.** Lado izquierdo: infraciliación somática y red longitudinal de microtúbulos asociada a ella.



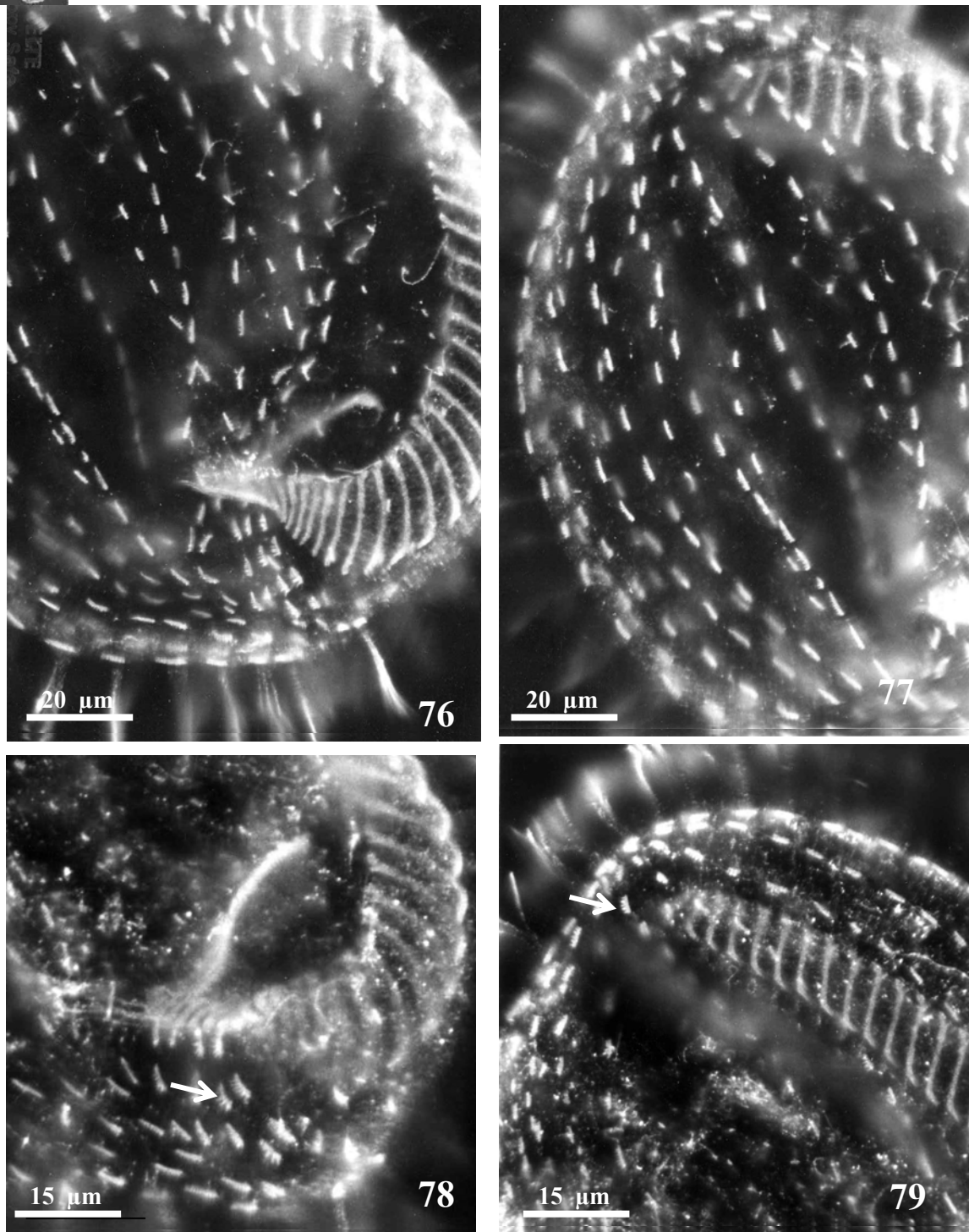
**Figs. 70-71.** Anticuerpo anti-tubulina monoglicilada TAP 952 (microscopía confocal). Lado izquierdo con infraciliación somática y red longitudinal de microtúbulos asociados a ella. Nótese la ausencia de cilios en las “paletas” situadas en la parte izquierda de la ZAM (flecha).



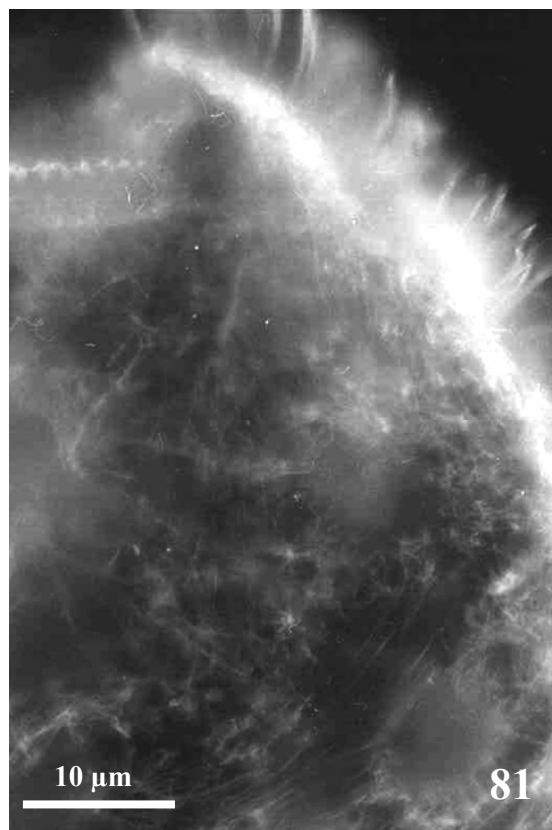
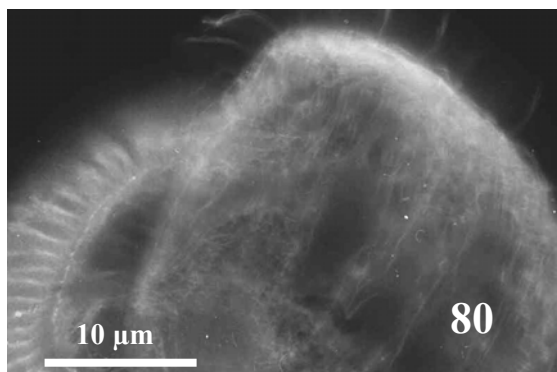


**Figs. 72-75.** Anticuerpo anti-tubulina poliglicilada AXO 49 (inmunofluorescencia indirecta). **72 y 74.** Aspecto general del lado izquierdo de la célula: se observan las cerdas dorsales, sin cilios, a la izquierda de la ZAM. **73.** Cilios somáticos en el lado derecho de la célula. **75.** Detalle de la infraciliación oral.





**Figs. 76-79.** Anticuerpo anti-Kd: fibra cinetodésmica (inmunofluorescencia indirecta). 76. Lado derecho. 77. Lado izquierdo. 78. Detalle de la zona posterior de la célula con mayor desarrollo de las fibras cinetodésmicas (flecha). 79. Detalle de las fibras cinetodésmicas (flecha) de la zona anterior.



**Figs. 80-81.** Anticuerpo dirigido contra epiplasma de *Paramecium* EP 33 (microscopía confocal).

#### 4.1.3.3. Otros sistemas citoesqueléticos

En *P. metchnikoffi*, el anticuerpo dirigido contra el epiplasma de *Paramecium* (EP 33) presenta una tinción difusa, sin que se aprecie claramente un epiplasma organizado.



#### 4.1.4. Ultraestructura celular

Si estudio celular se completa con la microscopía electrónica de transmisión, los resultados son los siguientes:

##### 4.1.4.1. Ultraestructura cortical

La superficie de la célula está limitada por una membrana unitaria que parece en algunos puntos estar recubierta por una capa de mucopolisacáridos laxa de aspecto granuloso (figs. 83 y 84).

Por debajo de la membrana plasmática, se distingue a veces una capa alveolar continua, poco desarrollada. No presenta el aspecto clásico de una sucesión de alvéolos, sino una delgada capa aplastada que se ve interrumpida en las zonas corticales donde emergen los cilios. Pegada a esta última, se distingue un fino estrato, de material más denso, que parece ser un delgado epiplasma (fig. 84). Desaparece cerca de los grupos ciliares y es más patente en el córtex bucal que en el somático (fig. 86).

Los resultados en microscopía electrónica confirman también dos tipos de formaciones microtubulares principales que se distribuyen por el citoplasma:

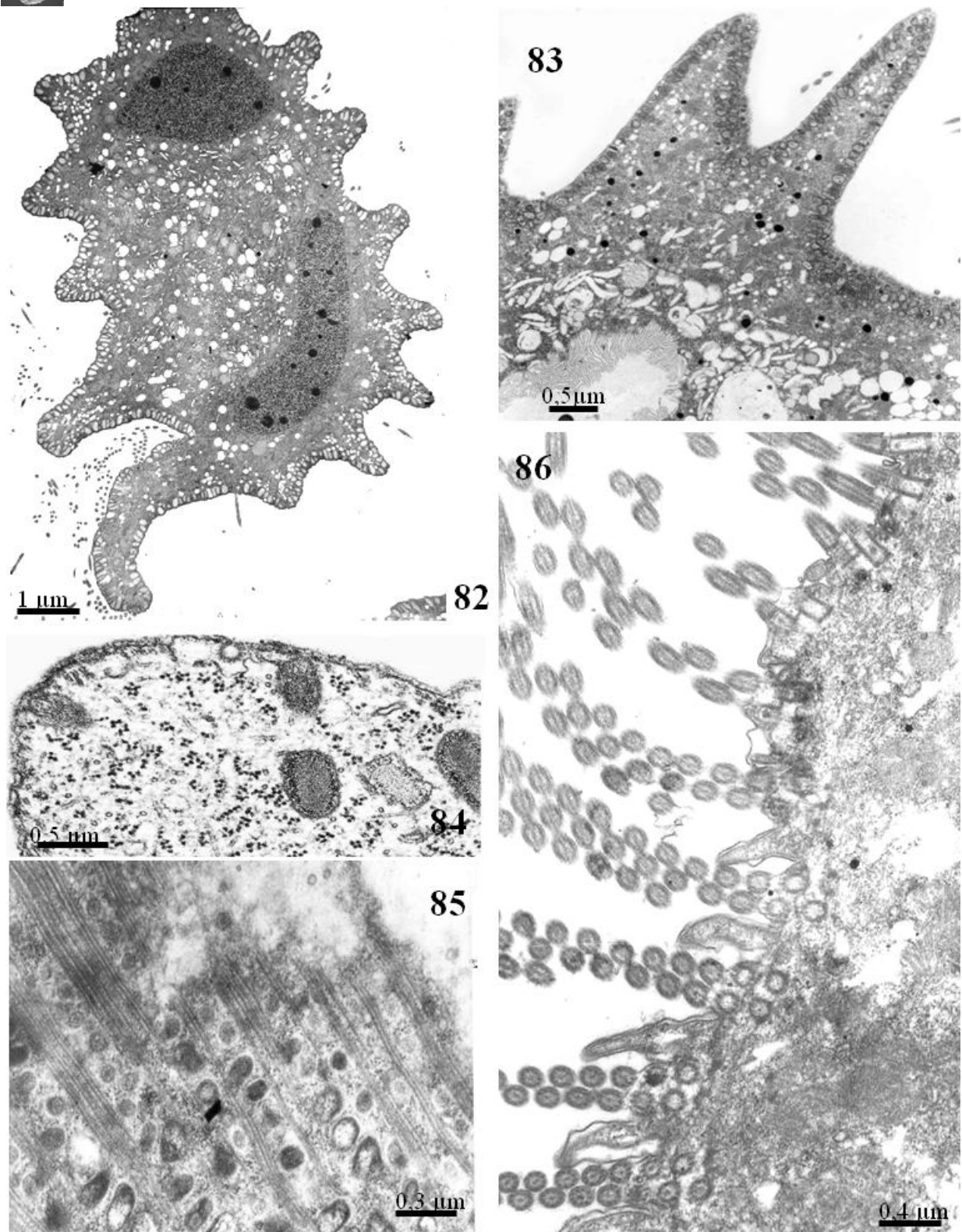
a) Las redes superficiales localizadas inmediatamente debajo del córtex (fig. 85). Su presencia queda de relieve tanto en las secciones transversales como en las tangenciales. Los microtúbulos subcorticales tienen un aspecto central claro y una periferia bien contrastada, y aparecen en grupos de 5 a 8. Las secciones tangenciales muestran finas estriaciones en la pared de los microtúbulos que dan el aspecto de fibras periódicas. Se disponen desde la parte anterior hacia la posterior y, como se verá más adelante, estos haces proceden de las fibras postciliares, que dan lugar al sistema cortical microtubular más importante en este ciliado.

b) La red microtubular profunda (fig. 84). Son microtúbulos situados anárquicamente por todo el citoplasma y no presenta estriación.

También se ha hecho ya mención de la presencia de numerosos mucocistos que se sitúan por debajo de la superficie celular, especialmente por debajo de las prominentes crestas ectoplasmáticas (fig. 83). Su frecuencia es tanto mayor cuanto lo es la madurez de la célula -donde desempeñan un papel de refuerzo de la forma celular- y, sobre todo, aparecen en los estadios prequísticos. Los mucocistos están rodeados de una suave capa de retículo endoplasmático rugoso y contienen los precursores de la pared quística.

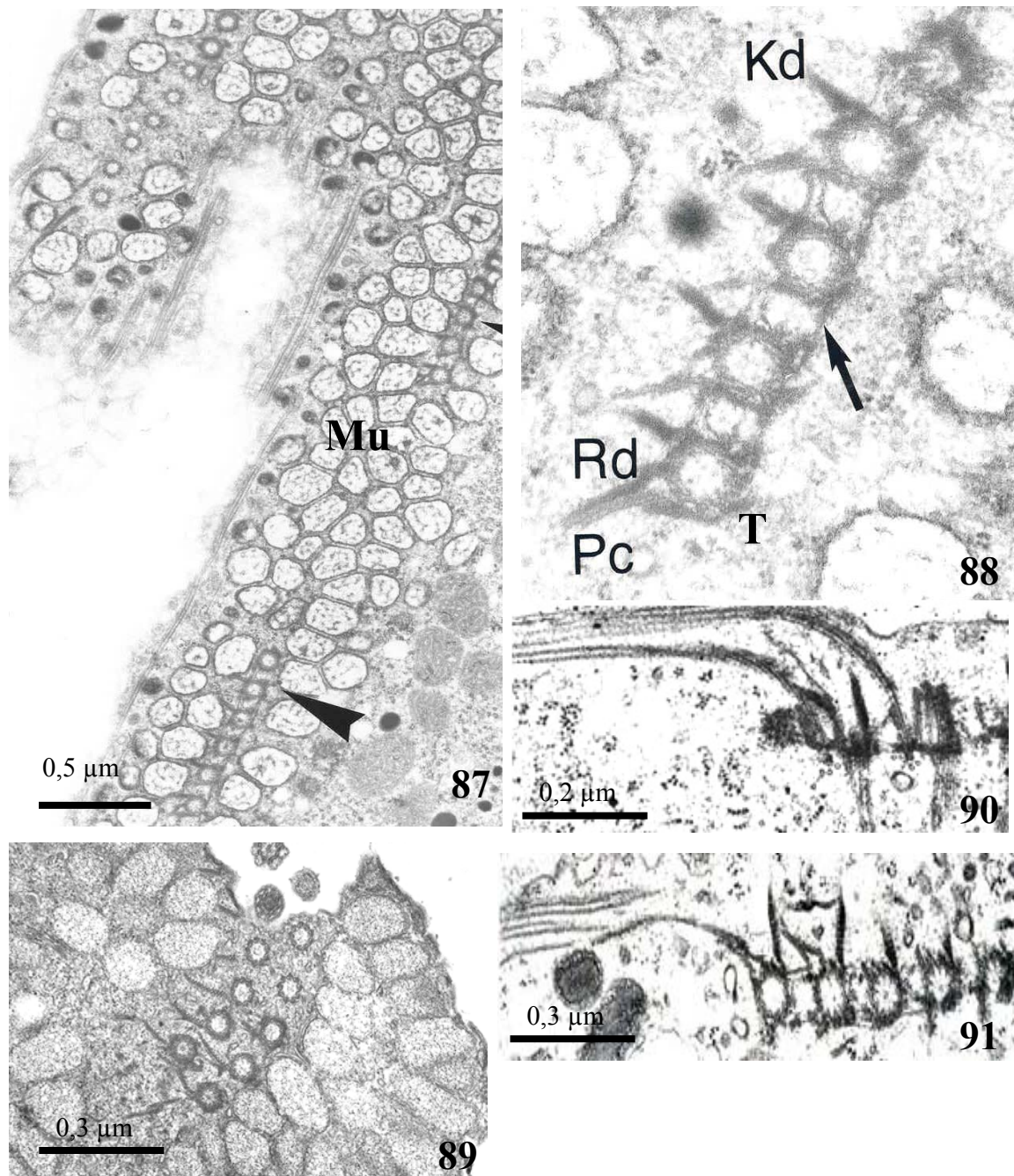
##### 4.1.4.2. Infraciliación somática

Está constituida por la alineación sucesiva de policinétidas (figs. 87-91). Cada una de ellas consta de 6 a 8 cinetosomas con sus derivados fibrilares (fig. 88), si bien, como ya se ha mencionado, en la periferia de la zona oral son dicinétidas (fig. 89). Sólo una parte en el lado izquierdo, cercana a la ZAM, presenta dicinétidas no ciliadas semejantes a las cinétidas dorsales de los hipotricos.



**Figs. 82-86.** Sección transversal de la célula vegetativa en un corte al microscopio electrónico de transmisión (MET). **82.** En el lado izquierdo, se observan 6 crestas dorsales y, en el derecho, 3. En este lado, hacia el polo posterior se distingue el borde en el que se dispone la ZAM. Por debajo del córtex somático, se distinguen numerosos mucocistos y, en el interior del citoplasma, dos estructuras más electrodensas que se corresponden con el macronúcleo. **83.** Detalle de una cresta cortical. **84.** Obsérvese la presencia de un fino epiplasma en algunas zonas del córtex. **85.** Grupos de microtúbulos subpeliculares longitudinales. **86.** Córtex bucal con mayor desarrollo de la capa alveolar.





**Figs. 87-91.** MET. **87.** Córtez somático con policinétidas somáticas (flecha). Se observan numerosos mucocistos (Mu) alrededor de ellas. **88.** Detalle de una policinétida somática con los cinetosomas y derivados fibrilares asociados (Kd: fibra cinetodésmica; Rd: fibra retrodesmal; Pc: fibra postciliar; T: fibra transversa). La flecha señala los desmosomas intercinetosómicos. **89.** Detalle de una “paleta” somática constituida por dobles filas de cinetosomas. **90-91.** Policinétida somática en corte tangencial: obsérvese la disposición de las fibras postciliares y raíces nemadésmicas en su base.



En todos los casos, todos los cinetosomas de cada “paleta” se conectan por desmosomas y, a su vez, cada cinetosoma está asociado a los siguientes derivados fibrilares (figs. 88 y 92):

a) Un haz de microtúbulos postciliares (entre 10 y 12), que se origina en el lado derecho posterior del triplete número 9. Las fibras postciliares de todos los cinetosomas de cada policinétida somática se reúnen formando gruesos paquetes fibrilares, que se dirigen por el lado derecho hacia la superficie reforzando longitudinalmente el córtex. Son estas fibras, con una estriación periódica, las que forman el sistema subcortical longitudinal, de naturaleza microtubular, del ciliado.

b) Un grupo de microtúbulos transversos ( $T_1$  con 2-4 microtúbulos) que aparecen en el cinetosoma anterior de las filas de monocinetidas y se sitúan sobre el triplete 5.

c) Otro microtúbulo adicional  $T_2$  (con 1 o 2 microtúbulos). En el resto de los cinetosomas de la policinétida, sólo se distinguen 1-2 microtúbulos transversos sobre el triplete 4 ó 5. Estos microtúbulos originan cortas fibras que se dirigen hacia la izquierda.

d) Una fibra cinetodésmica, de naturaleza periódica, orientada hacia la derecha y hacia delante. Se origina junto a los tripletes 5 y 6 (por su composición proteica aparecía intensamente teñida en las preparaciones de carbonato de plata).

Otras formaciones son:

a) Un denso espolón. Se sitúa unido al triplete 8 y es de la misma naturaleza que el señalado por debajo de los microtúbulos postciliares. En el caso de las dicinetidas, además del espolón anterior, aparece el mismo material asociado a los tripletes 2, 3 y 4, así como por debajo de los microtúbulos postciliares, pero en este caso forma un soporte mucho más patente.

b) Una red microtubular nemadésmica (fig. 90) y una red nodular microfibrilar que se origina en la zona proximal por debajo de los cinetosomas.

c) Material denso asociado a la policinétida. La zona próxima de los cinetosomas muestra un material denso, sin estructura. Si consideramos su presencia en todos los cinetosomas de la policinétida, se puede entender la imagen de “soporte” fuertemente teñido por la plata en las “paletas” descritas a microscopía óptica (fig. 90).

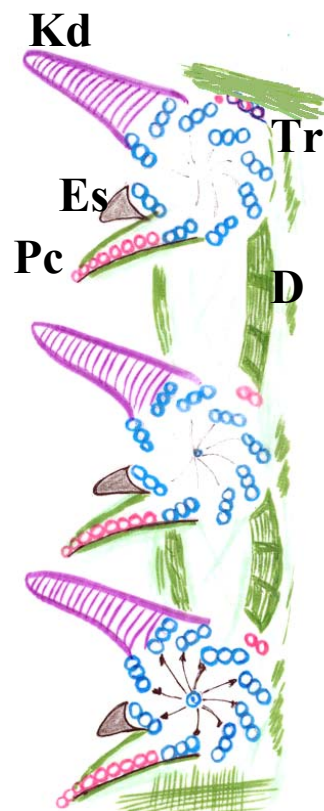
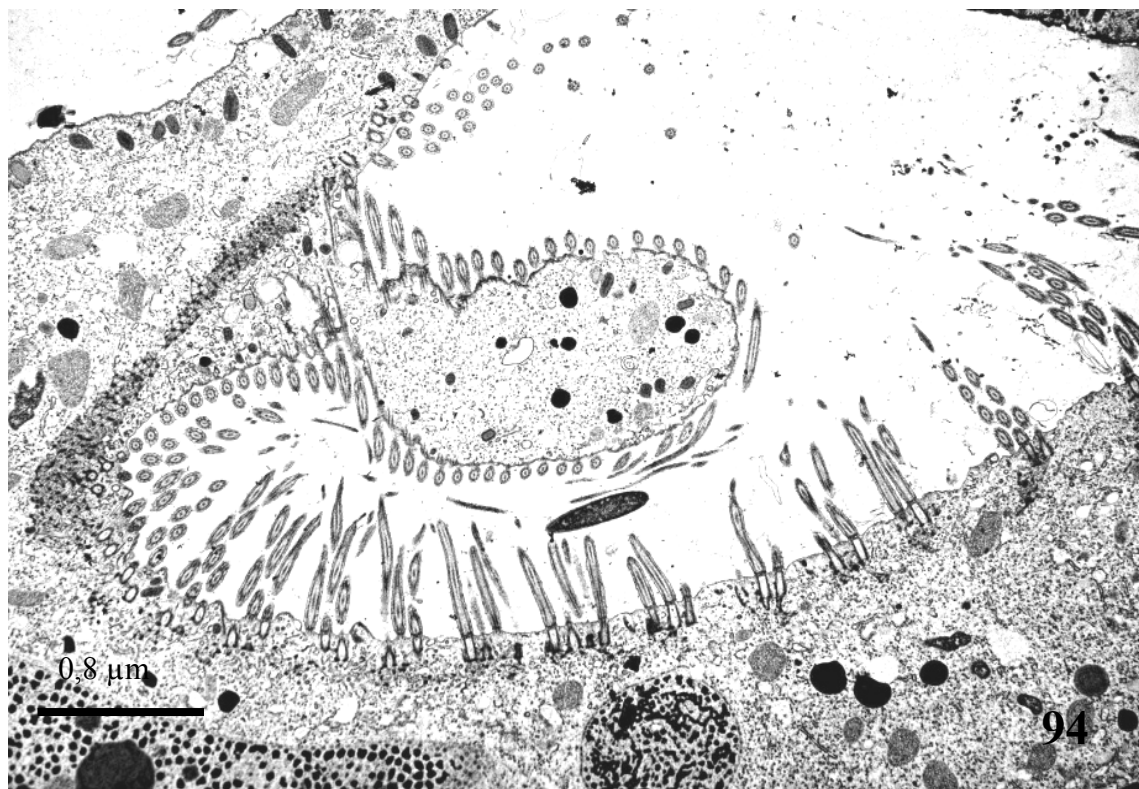
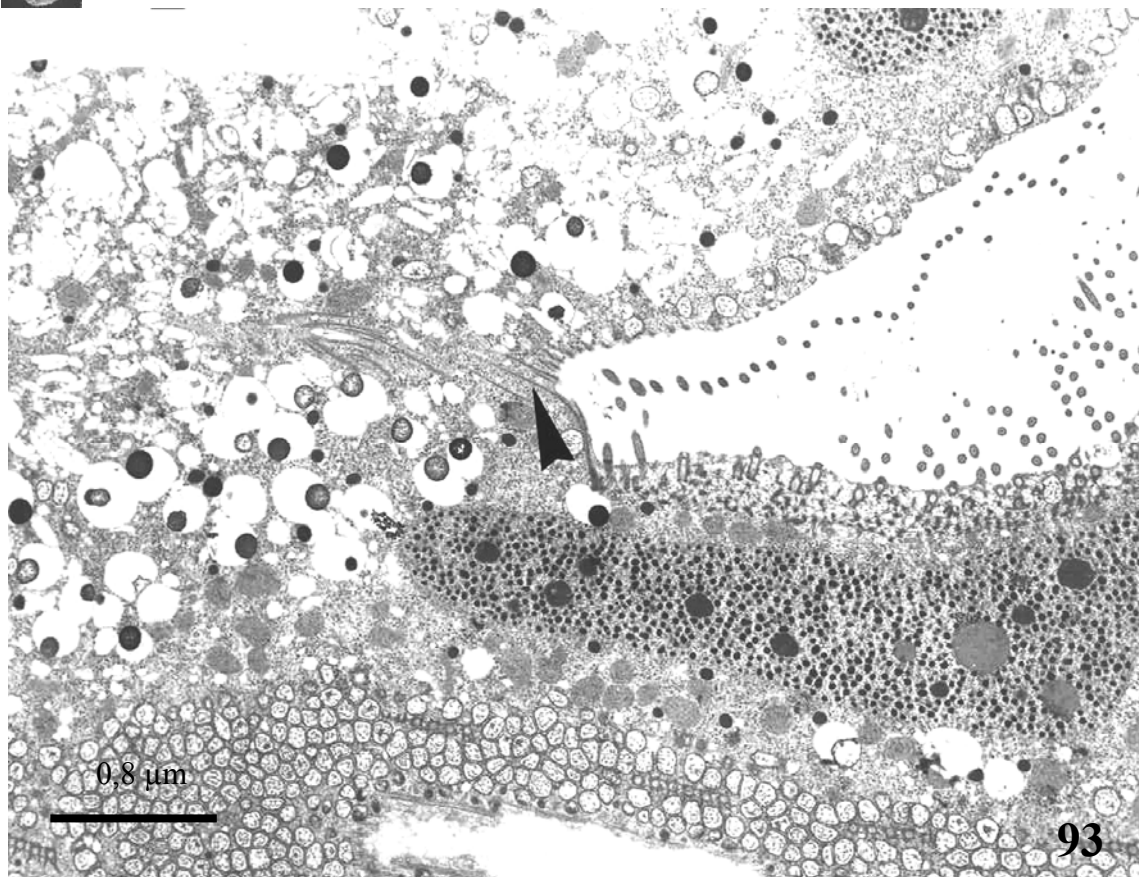


Fig. 92: Esquema de la policinétida.



**Figs. 93 y 94.** Aspecto general de la zona oral con la ZAM y la formación paroral. (MET). **93.** La flecha señala la fibra postoral. **94.** En la base de la ZAM, se ha marcado la red microfibrilar nodular.



#### 4.1.4.3. Ultraestructura oral

**La zona adoral de membranelas (ZAM)** tiene un longitud entre 94 y 133  $\mu\text{m}$  y comprende una media de 50 paramembranelas separadas por crestas ectoplasmáticas. Cada una de ellas consta de cuatro filas de cinetosomas (fig. 86). Se pueden distinguir dos regiones en la ZAM (figs. 33 y 35):

##### a) Zona anterior.

Se extiende desde el polo anterior hasta el comienzo de la abertura bucal. Suelen ser entre 24 y 28 paramembranelas, cada una con 4 filas organizadas de la siguiente forma:

- Fila anterior con 3 cinetosomas.
- Fila intermedia con 8-10 cinetosomas.
- Dos filas posteriores, 3ª y 4ª, de mayor longitud, con 20-30 cinetosomas. El extremo anterior de la cuarta fila de cinetosomas está desplazada 45° hacia la derecha del eje de la membranela. Los cinetosomas de las paramembranelas se conectan por desmosomas.

Las paramembranelas anteriores muestran una fila de cinetosomas no ciliados. Éstos aparecen junto a sacos parasomales y redes microfibrilares nodulares.

En cada paramembranela, los cinetosomas de las dos filas más posteriores portan fibras microtubulares postciliares muy desarrolladas y conectadas al triplete 9 (fig. 96). Esta fibra se curva alrededor un material denso (fig. 98).

La parte inferior de las filas de cinetosomas se une con una red nodular microfibrilar formando un haz que conecta con las paramembranelas adyacentes (fig. 95).

Las filas anteriores de las membranelas presentan un único microtúbulo postciliar. Los cinetosomas de la fila izquierda se asocian con 1 ó 2 microtúbulos transversos, que son también visibles en los cinetosomas de las otras filas.

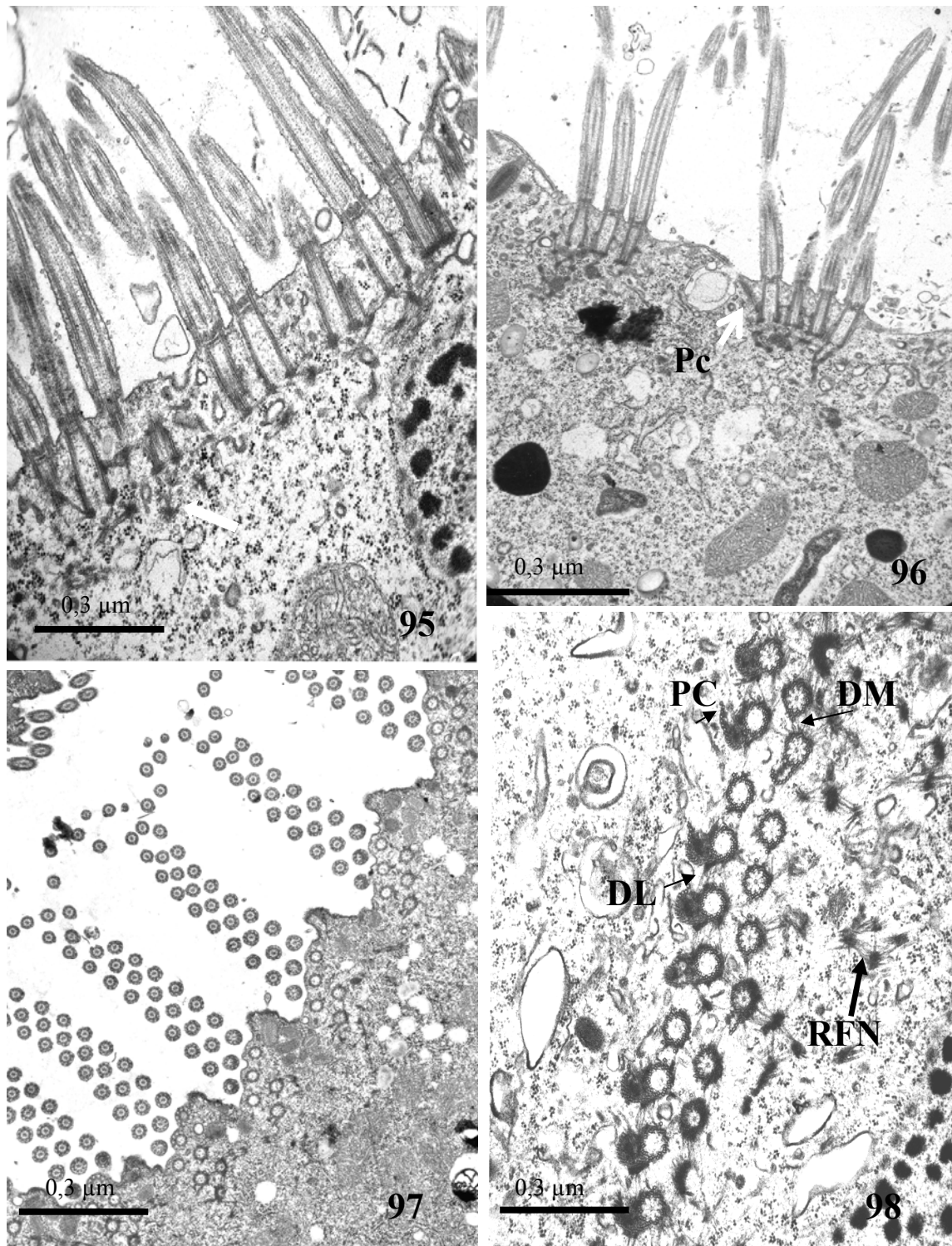
Los cinetosomas de las diferentes filas se conectan por desmosomas y aquellos otros situados en la fila interna lo hacen por una red microfibrilar nodular (fig. 98). Sin embargo, no se observan nemadesmos.

##### b) Zona posterior.

Es la que se introduce en el infundíbulo (figs. 93 y 94). Son 12-15 paramembranelas que, en su extremo final, tienen sólo tres filas.

**El complejo paroral** se sitúa alrededor de la protuberancia infundibular (fig. 94). Está formado por filas oblicuas de cinetosomas, cada una de ellas constituida por 7 u 8 unidades (fig. 34). Sólo los cinetosomas situados más a la izquierda de cada fila son ciliados y portan una fibra postciliar (figs. 93 y 94). Por debajo del complejo paroral, se distingue una red fibrilar, muy desarrollada, con nódulos de condensación (fig. 94).





**Figs. 95-98.** Estructura de las paramembranelas (MET). **95-96.** Cortes tangenciales de paramembranelas de la ZAM: en su base, se observan la red fibrilar nodular (flecha) y la fibra postciliar (Pc) asociada a los cinetosomas de la cuarta fila de cada paramembranela; además, se aprecian numerosas mitocondrias. **97-98.** Corte transversal de la ZAM: nótese el epiplasma más patente en las crestas de la cavidad oral (flecha) y los derivados fibrilares asociados a las paramembranelas. Pc: fibra postciliar; RFN: red fibrilar nodular; DM: desmosomas.



#### 4.1.4.4. Orgánulos citoplasmáticos

En las células vegetativas maduras se pueden observar los siguientes orgánulos:

a) Numerosas mitocondrias con crestas tubulares (figs. 95 y 96).

b) Vacuolas digestivas de gran tamaño en dos estadios:

-Vesícula con una membrana no invaginada, muy contrastada.

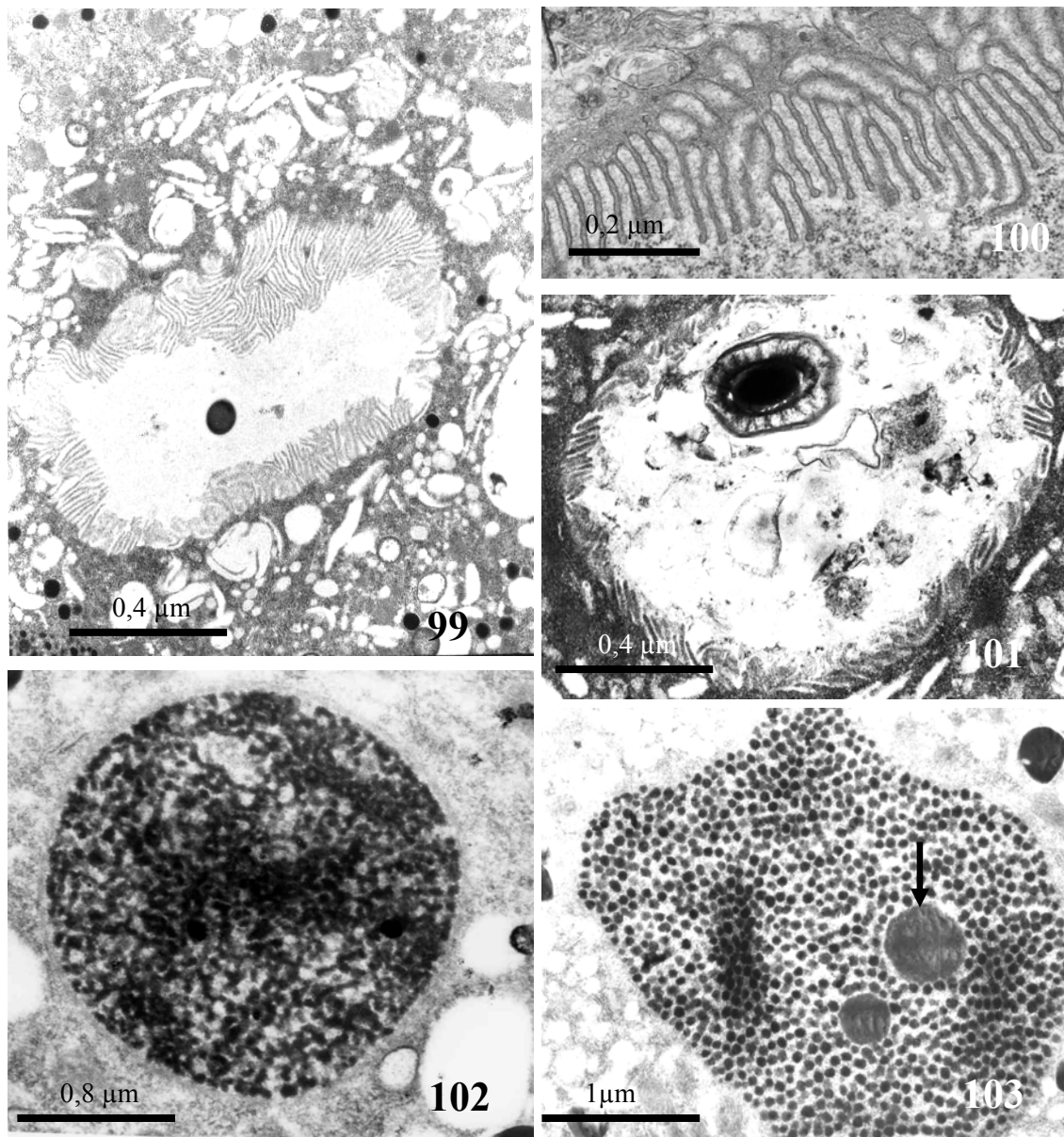
-Vesículas con numerosas expansiones citoplasmáticas dirigidas hacia el interior de la vacuola (figs. 99-101). Estas expansiones son paralelas, a veces ramificadas y, en ocasiones, acaban en ampollas o vesículas (fig. 100). El citoplasma intralamelar contiene filamentos muy finos, seguramente con función estructural.

El interior de las vacuolas presenta bacterias y otras partículas alimenticias en distintos estadios de digestión (fig. 101).

c) Aparato nuclear

El macronúcleo de *P. metchnikoffi* está constituido por una cromatina organizada en numerosos granos condensados. Estos cuerpos son de forma irregular, de tamaño entre 0,1 y 0,2  $\mu\text{m}$ , y presentan una elevada electrodensidad. El macronúcleo contiene varios nucléolos (fig. 103).

Los micronúcleos se presentan en número medio de 4, aunque en algunos individuos pueden ser hasta 7 (fig. 102).



**Figs. 99-103.** Endoplasma (MET). **99.** Vacuola digestiva con numerosas expansiones. **100.** Invaginaciones de la membrana vacuolar: la parte distal de cada invaginación aparece dilatada. **101.** Cuerpos en digestión en el interior de la vacuola digestiva. **102.** Micronúcleo. **103.** Macronúcleo: masas de heterocromatina y nucleolos (flecha).

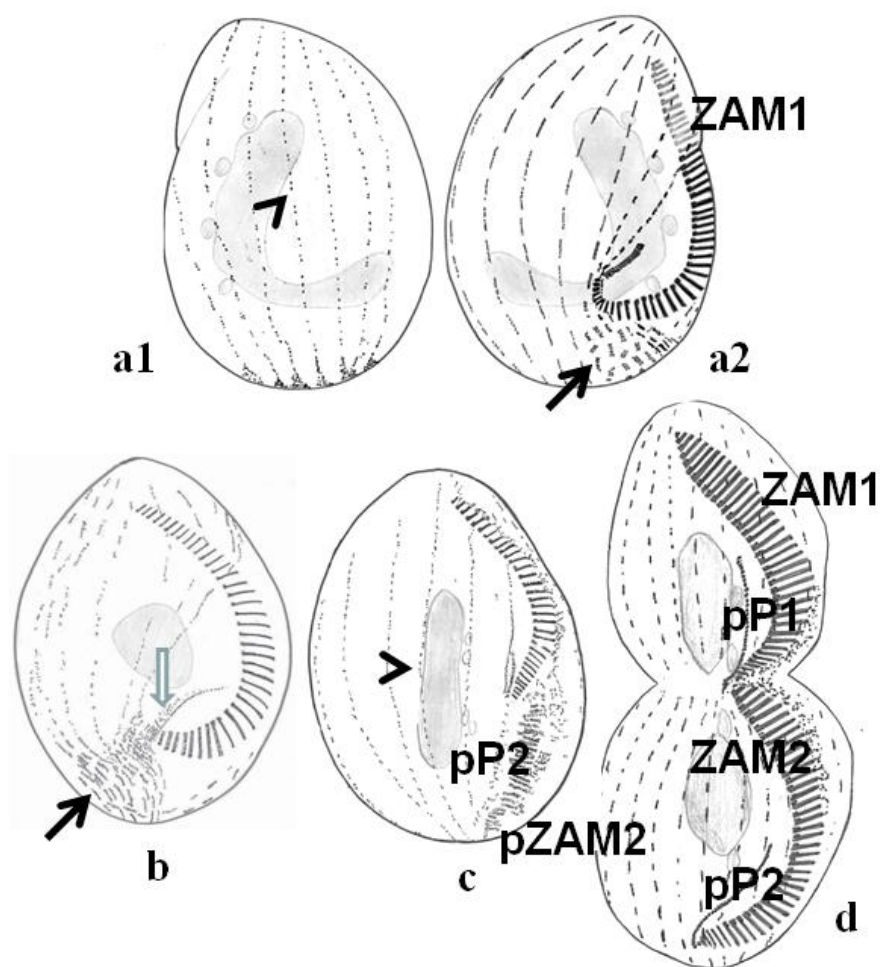


## 4.2. MORFOGÉNESIS DE DIVISIÓN

En *Phacodinium metchnikoffi*, al igual que en otros ciliados, el comienzo del proceso morfogénico se detecta por una serie de cambios morfológicos en la célula vegetativa:

- La célula se hace más redondeada y arqueada por el lado dorsal.
- Los micronúcleos aumentan de tamaño.

Se han estudiado los procesos morfogénicos, especialmente el proceso de estomatogénesis, utilizando tanto la impregnación argéntica como, fundamentalmente, anticuerpos específicos frente a proteínas relacionadas con los microtúbulos en proceso de ensamblaje (CTR210) o axonemales (AXO 49). Los acontecimientos sucesivos pueden separarse en cuatro estadios (fig. 104):



104

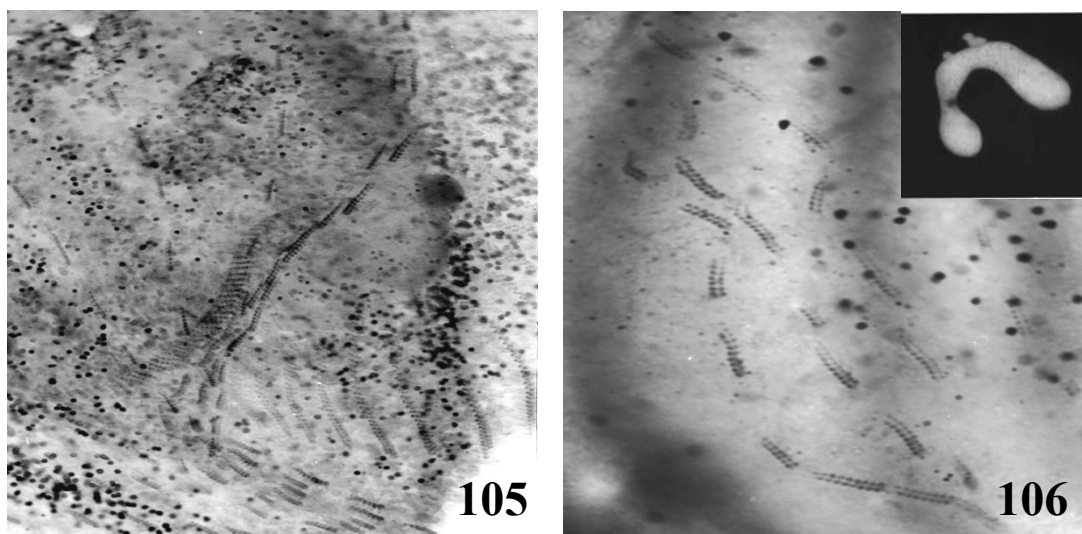
**Fig. 104.** Estadios de la morfogénesis de división en *Phacodinium metchnikoffi*. **a1**: desorganización de las policinétidas del lado derecho y proliferación de cinetosomas de las hileras somáticas en el polo posterior; **a2**: proliferación de las cinetias postorales posteriores (flecha) y formación del primordio oral; ZAM1: ZAM parental (punta de flecha); **b**: desorganización y proliferación de las policinétidas somáticas y desorganización del complejo paroral (flecha blanca); **c**: pZAM2-primordio de la ZAM del opisto. Desorganización parcial de la ZAM y de la paroral del proter (cabeza de flecha) **d**: pP1 y pP2, primordios de la paroral de proter y opisto.



\*Estadio 1 (figs. 105-106):

En el polo posterior, 6-8 hileras de “paletas” dobles del lado derecho-ventral, situadas por debajo de la ZAM parental, comienzan a individualizarse, pierden las uniones intercinetosómicas y fibras asociadas, y forman cortas hileras de cinetosomas (fig. 105).

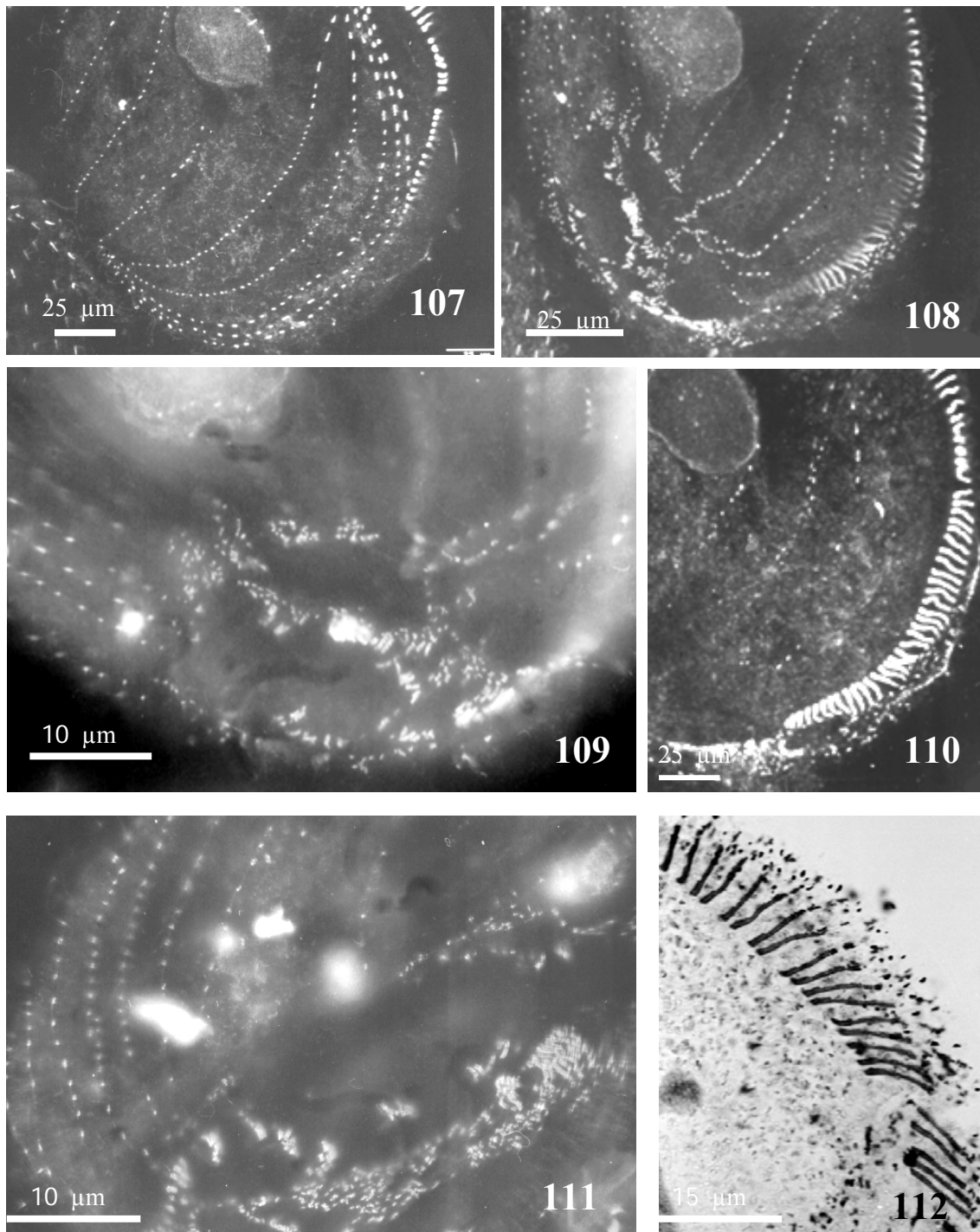
Posteriormente, las hileras se desorganizan y comienzan a proliferar. Los fragmentos de los cinetosomas siguen proliferando y se transforman en un campo anárquico que alcanza al lado dorsal (fig. 106).



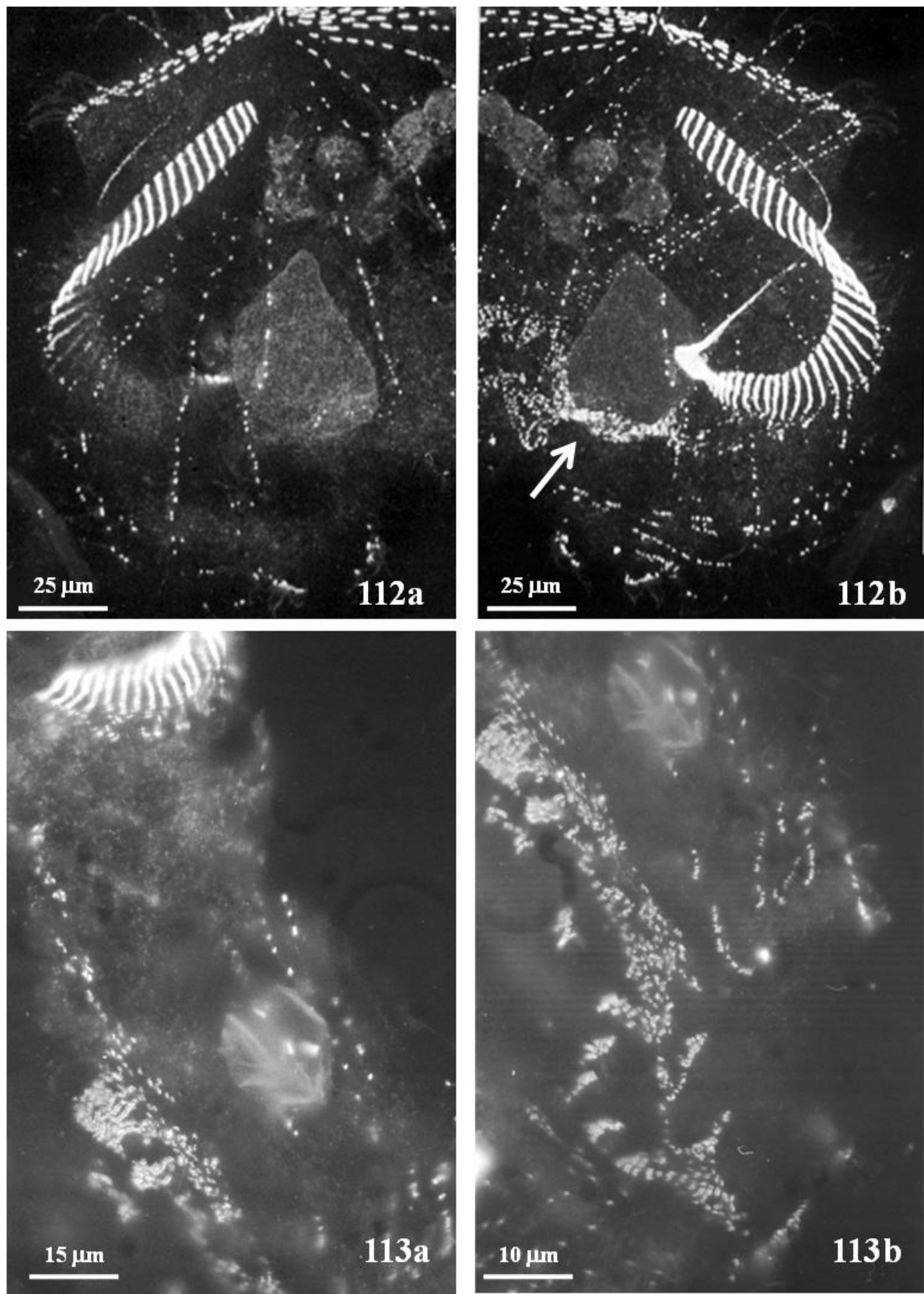
**Figs. 105-106.** (Tinción argéntica). **105.** Desorganización de la infraciliación somática en el polo posterior. **106.** En la esquina superior derecha se observa un detalle del macronúcleo.

El macronúcleo, todavía en forma de herradura, presenta los extremos dilatados (zonas de reorganización de la cromatina) y los micronúcleos comienzan a alargarse (fig. 106).





**Figs. 107-111.** Anticuerpo CTR210 (inmunofluorescencia indirecta). **107.** Comienzo de la desorganización de la infraciliación somática. **108.** Detalle del polo posterior: inicio de la formación del primordio oral durante la estomatogénesis del ciliado (flecha). **108 y 109.** Fase de proliferación y formación del primordio oral durante la estomatogénesis. **110, 111 y 112.** Desorganización parcial de la ZAM parental (fig. 112: tinción argéntica).



**Figs. 112-113.** Anticuerpo CTR210. **112.** Microscopía confocal. **a.** Lado izquierdo: proliferación en la zona ecuatorial de las cinetias somáticas. **b.** Lado derecho: la flecha señala el primordio oral del opisto. **113.** Inmunofluorescencia indirecta: comienzo de la diferenciación de la ZAM durante la estomatogénesis.



**\*Estadio 2 (figs. 107-112):**

La célula adquiere forma esférica, el macronúcleo se redondea y se produce la condensación de la cromatina. Al terminar este estadio, los micronúcleos finalizan la mitosis.

La zona de proliferación de cinetosomas formada en la zona posterior del lado derecho comienza a ser más densa y se forma un campo de anárquico de los diferentes cinetosomas, que proceden de cada una de las hileras. Al final de este estadio, se distinguen pequeñas filas paralelas de dos cinetosomas, cuyo ensamblaje formará la ZAM del opisto.

Cuando las paramembranas empiezan a visualizarse, es posible empezar a ver en la parte más interna la formación, a partir del mismo campo de cinetias, de la nueva paroral. Este esbozo bucal del opisto está en posición perpendicular a la boca del protero.

Tanto la infraciliación paroral del protero, como la cinetia somática más cercana a la paroral, sufren en este punto una desorganización con multiplicación y ruptura en numerosos segmentos de cinetosomas en pares muy apretados; al menos los cinetosomas de la cinetia somática, cercanos al campo de proliferación del opisto, participan en el primordio oral de éste. La formación paroral aparece desplazada con respecto a la ZAM.

La zona adoral comienza a tener una reorganización parcial: se produce una rotación en la cuarta fila de cada paramembrana de todas las unidades de la ZAM y se sitúa ligeramente abierta para quedar totalmente paralela a la tercera fila de cada paramembrana, algunos de cuyos cinetosomas, situados hacia el exterior de la célula, aparecen sueltos, como si estuvieran reorganizándose. Desaparecen las uniones entre las paramembranas.

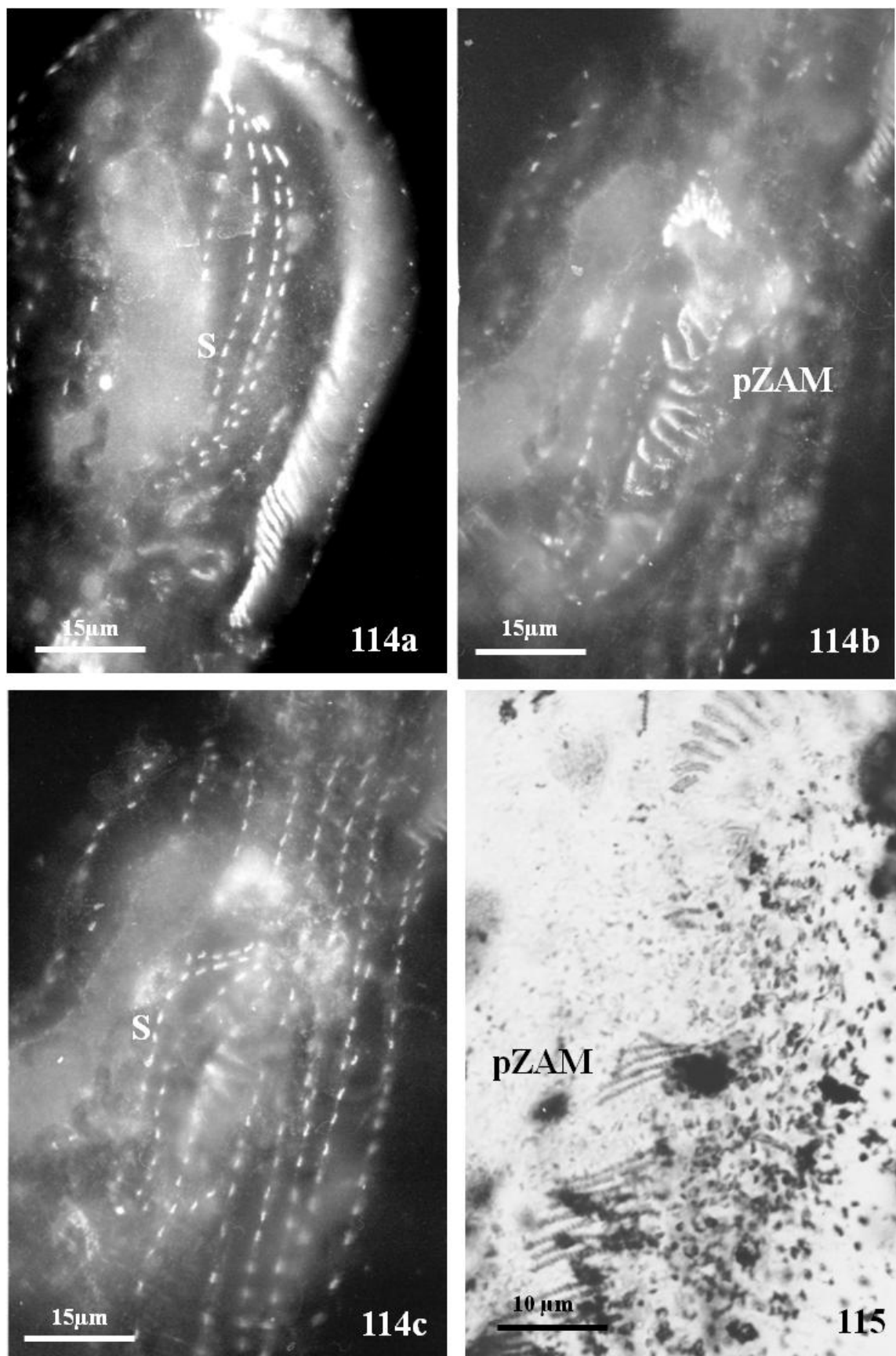
Los nemadesmos del protero se reabsorben en su totalidad.

**\* Estadio 3 (figs. 114-120):**

Al comienzo de la constricción ecuatorial, el macronúcleo aparece alargado y los micronúcleos se unen por finos filamentos.

La célula aumenta en longitud y la parte inferior de la boca del opisto sufre una rotación de 90°C para alinearse con la boca del protero.



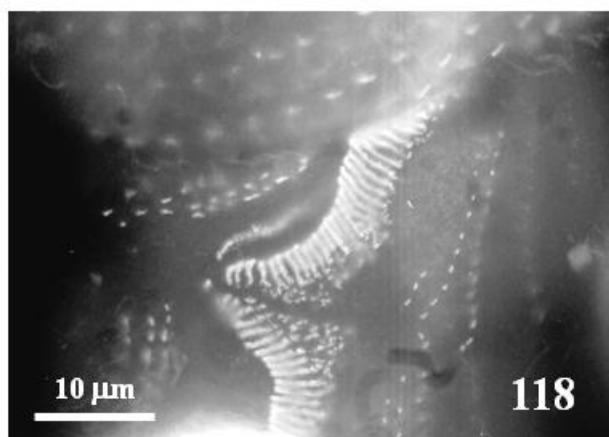
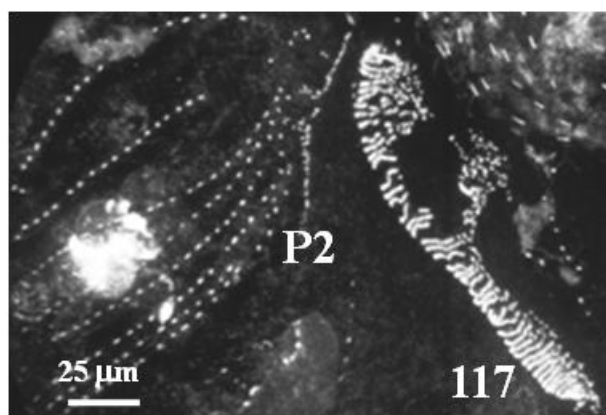
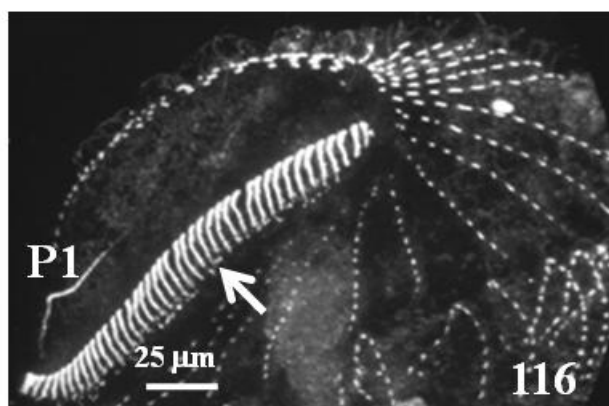


**Figs. 114-115.** Morfogénesis de división. 114 a-c. Anticuerpo CTR210 (inmunofluorescencia indirecta). 115. Impregnación argéntica. S: infraciliación somática; pZAM: primordio de la zona adoral de membranelas en el opisto.



Las dos franjas adorales forman una banda continua: casi todas las membranelas del opisto se complementan entonces con cuatro filas. Todos los elementos bucales nuevos son ciliados.

El primordio de cinetosomas de la paroral se desplaza hacia arriba, en el protero, donde los pares de la cinetia somática 1 y los que van a formar la paroral se orientan perpendicularmente.



**Figs. 116-118.** Anticuerpo CTR210 (inmunofluorescencia indirecta). **116.** Desorganización parcial de la ZAM parental en el protero (flecha) y paroral de nueva formación (P1). **117.** Organización de las paramembranelas en la ZAM del opisto: se observa también la nueva paroral (P2). **118.** Final del proceso de estomatogénesis.

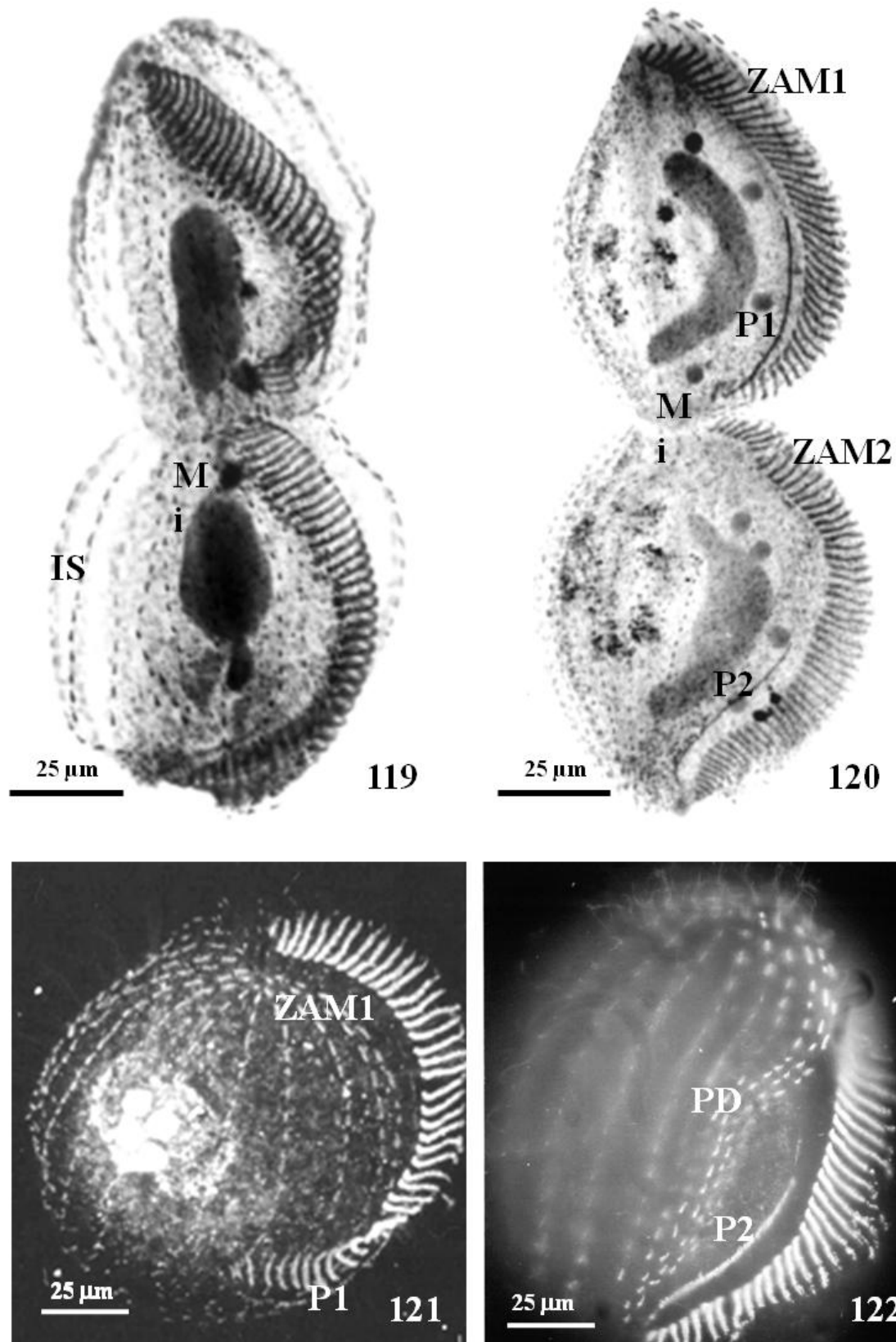
\* Estadio 4 (figs. 121-125):

La división finaliza con dos células jóvenes redondeadas, tomitos, que todavía no tienen la infraciliación bucal del individuo adulto. La paroral está formada por pares de cinetosomas, los nemadesmos no están desarrollados y las primeras membranelas constan de dos filas.

Según la célula toma su morfología habitual, se produce una torsión fuerte que sitúa el embudo bucal en la zona posterior.

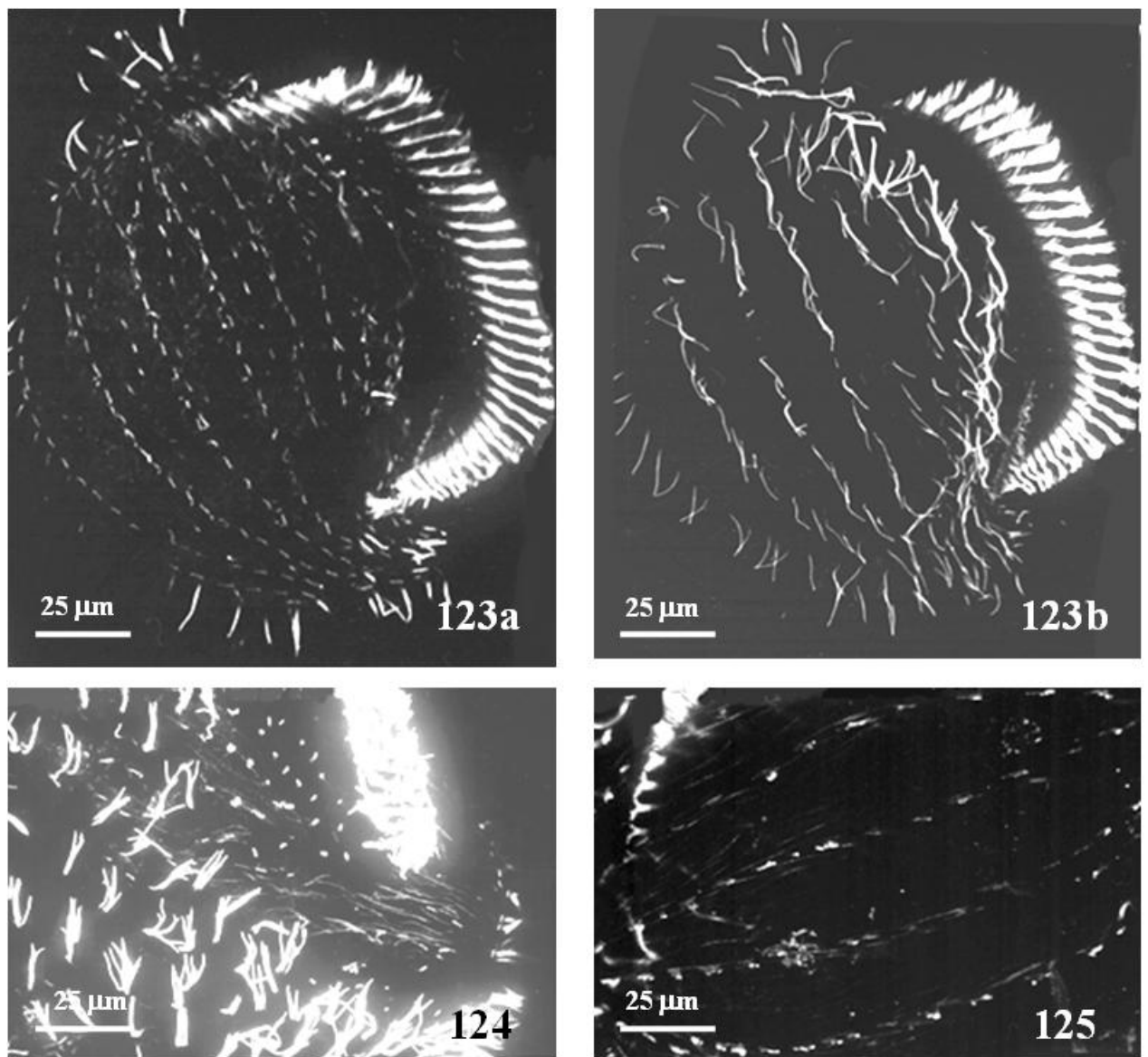
En el córtex somático, se aprecian ya las “paletas” con el soporte denso que las caracteriza, pero algunas todavía sólo están constituidas por dos cinetosomas.

Por tanto, considerando los patrones estomatogénicos establecidos por Corliss (1973) y revisados por Foissner (1996), el proceso descrito para *Phacodinium metchnikoffi* es de tipo paracínético y de subtipo poliparacínético, ya que dos o más cinetias postorales están implicadas en la formación del primordio oral.

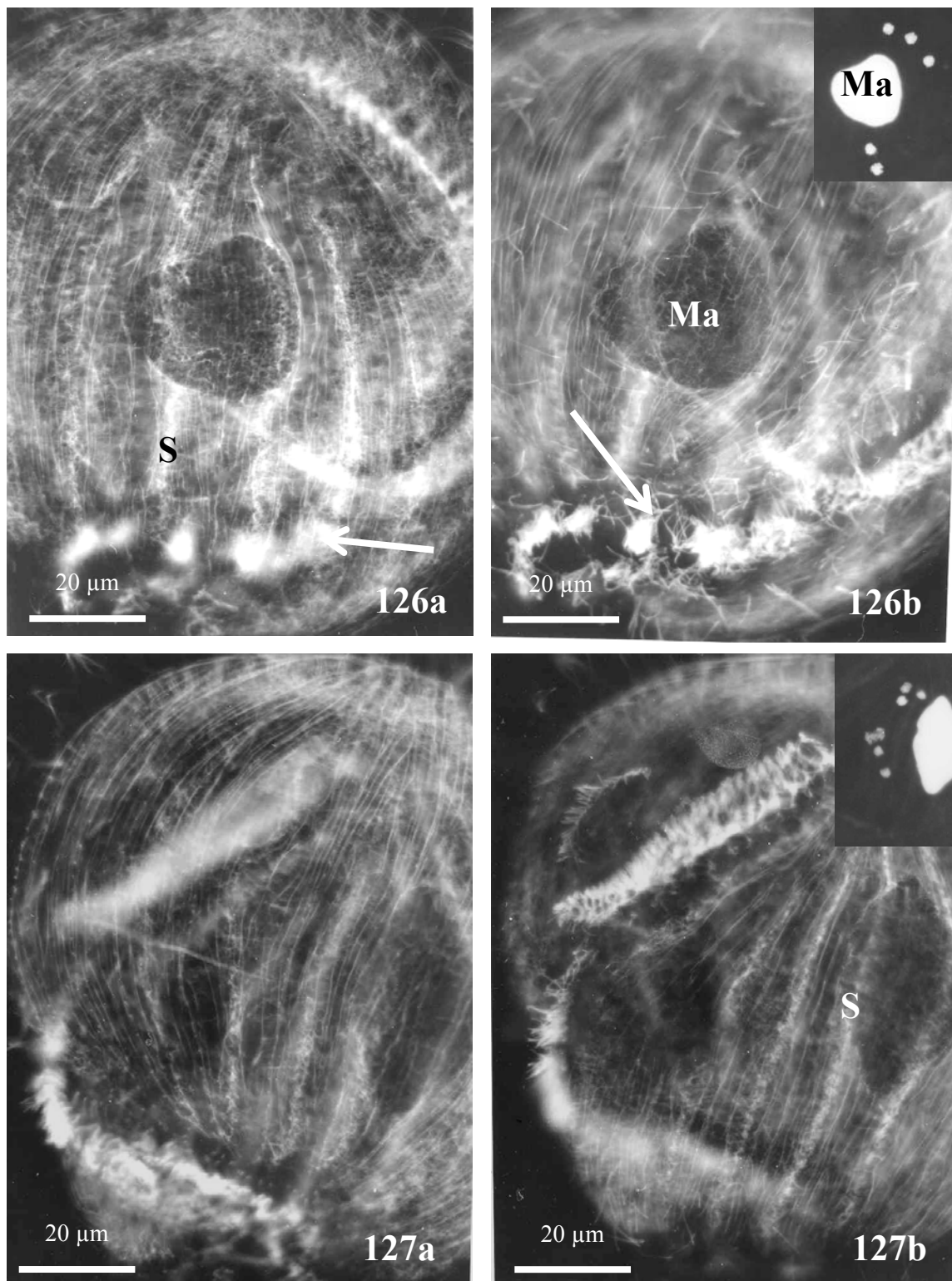


**Figs. 119-120.** Final de la división (tinción argéntica). **121-122.** Formación de los tomites: anticuerpo CTR210 (inmunofluorescencia indirecta).

Mi: micronúcleos; ZAM1: zona adoral de membranelas del prótero; ZAM2: zona adoral de membranelas del opisto; P1: paroral del protero; P2: paroral del opisto; IS: infraciliación somática; PD: paletas dobles en el lado derecho.



**Figs. 123-125.** Anticuerpo AXO 49 (microscopía confocal). **123a-b.** Tomitos. **124.** Lado izquierdo: cerdas dorsales. **125.** Detalle de la formación temprana de las fibras postciliares.



**Figs. 126-127.** Anticuerpo TEU 348 (microscopía confocal). Redes longitudinales corticales y red intracitoplásmica (débilmente teñida) en una célula en división. **126 a y b.** Lado izquierdo y derecho, respectivamente. La flecha señala el primordio oral: las zonas de proliferación de la infraciliación somática aparecen teñidas con mayor intensidad (S). **127 a y b.** Estadio posterior de otra célula con mayor desarrollo del primordio oral. Obsérvense los estadios sucesivos del macronúcleo (Ma) y los micronúcleos en la esquina superior derecha.



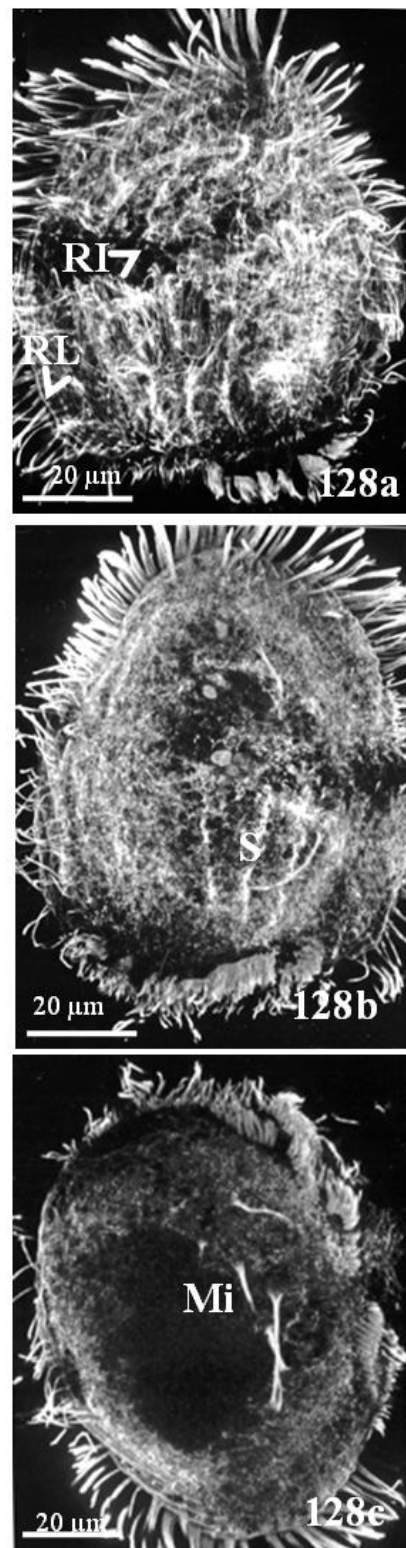
#### 4.2.1. Comportamiento de las redes microtubulares durante la morfogénesis

La tubulina glutamilada (figs. 128a-c) permaneció visible durante todo el proceso de división y se observó tanto en la red superficial como en la interna, en los primordios orales y somáticos y en los haces que constituyen el huso de división.

Cuando empieza a formarse el surco de división (ya se han formado los primordios orales en protero y opisto), se observa una fragmentación en la zona ecuatorial de la red longitudinal cortical de microtúbulos glutamilados; también se ponen de manifiesto con este anticuerpo los microtúbulos asociados a la división micronuclear.

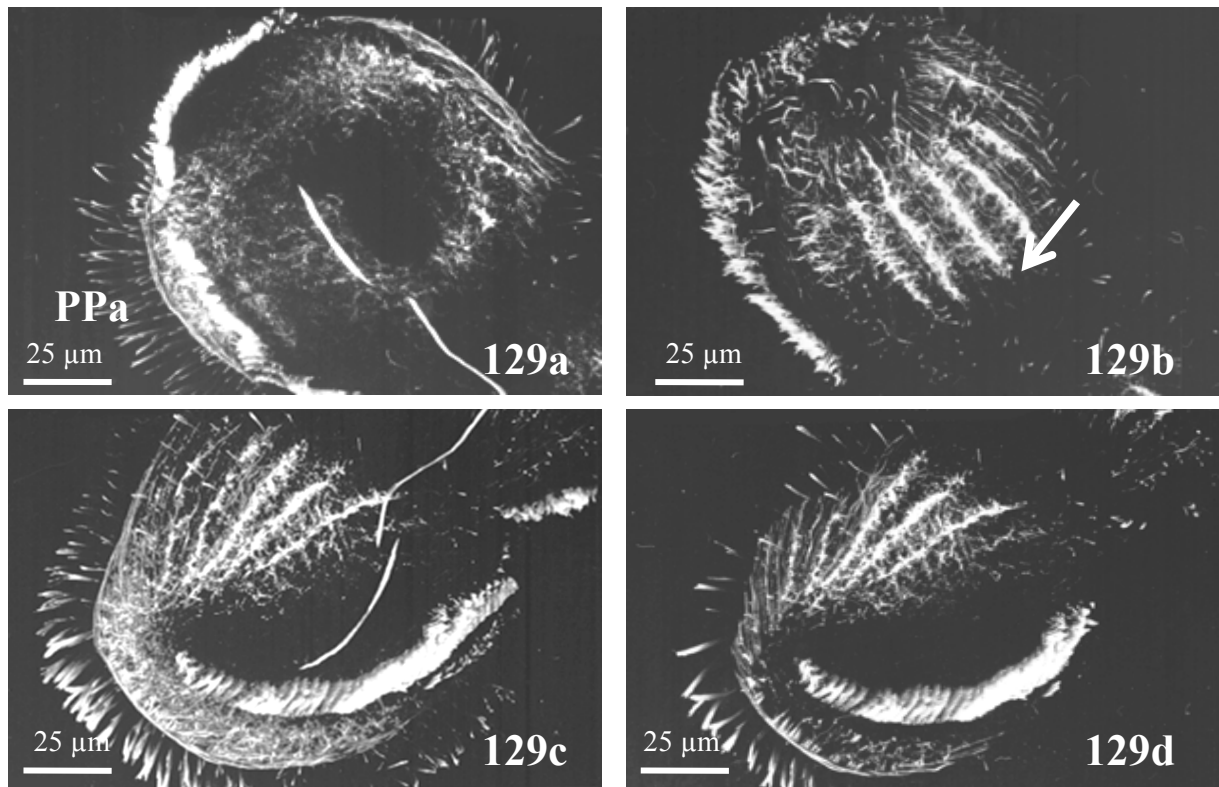
La tubulina acetilada (figs. 129-130) presentó una pauta de distribución muy similar a la descrita para la glutamilada, con la excepción de la red longitudinal superficial, que se tiñó muy débilmente, y de los microtúbulos localizados bajo las membranelas, en los que la presencia de tubulina acetilada fue más evidente, así como debajo de las crestas corticales.

Sobre la red intracitoplásmica, tanto el anticuerpo general (TEU 435), como los anticuerpos GT335 y TEU 348, revelan que esta red no se desorganiza, siendo más “compacta” en la zona donde se originará el primordio oral del opisto. Los cilios de la ZAM del protero y la ciliación somática, excepto probablemente en la zona del primordio, son todavía visibles. En una segunda fase, desaparecen los cilios somáticos, pero permanece la red intracitoplásmica, muy compleja. En los jóvenes tomitos, la red está totalmente desarrollada (figs. 131a-d).

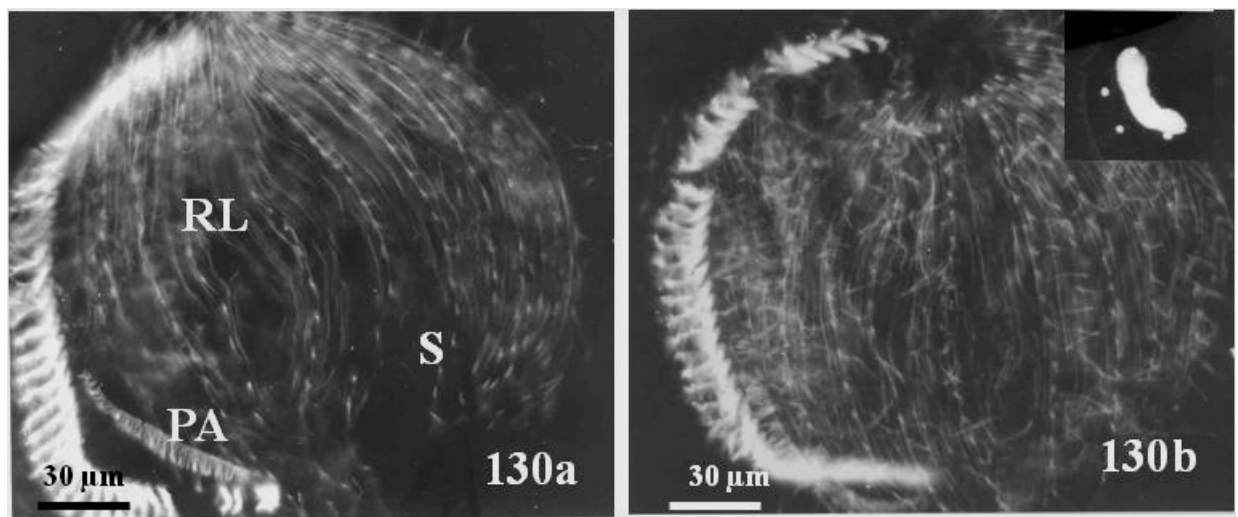


**Figs. 128a-c.** Anticuerpo GT335 (microscopía confocal). Redes longitudinales corticales (RL) y red intracitoplásmica (RI) en una célula en división: **a**, la cabeza de flecha señala el primordio oral; **b**, las zonas de proliferación de la infraciliación somática aparecen teñidas con mayor intensidad (S); **c**, se observan también microtúbulos glutamilados implicados en la división de los micronúcleos.

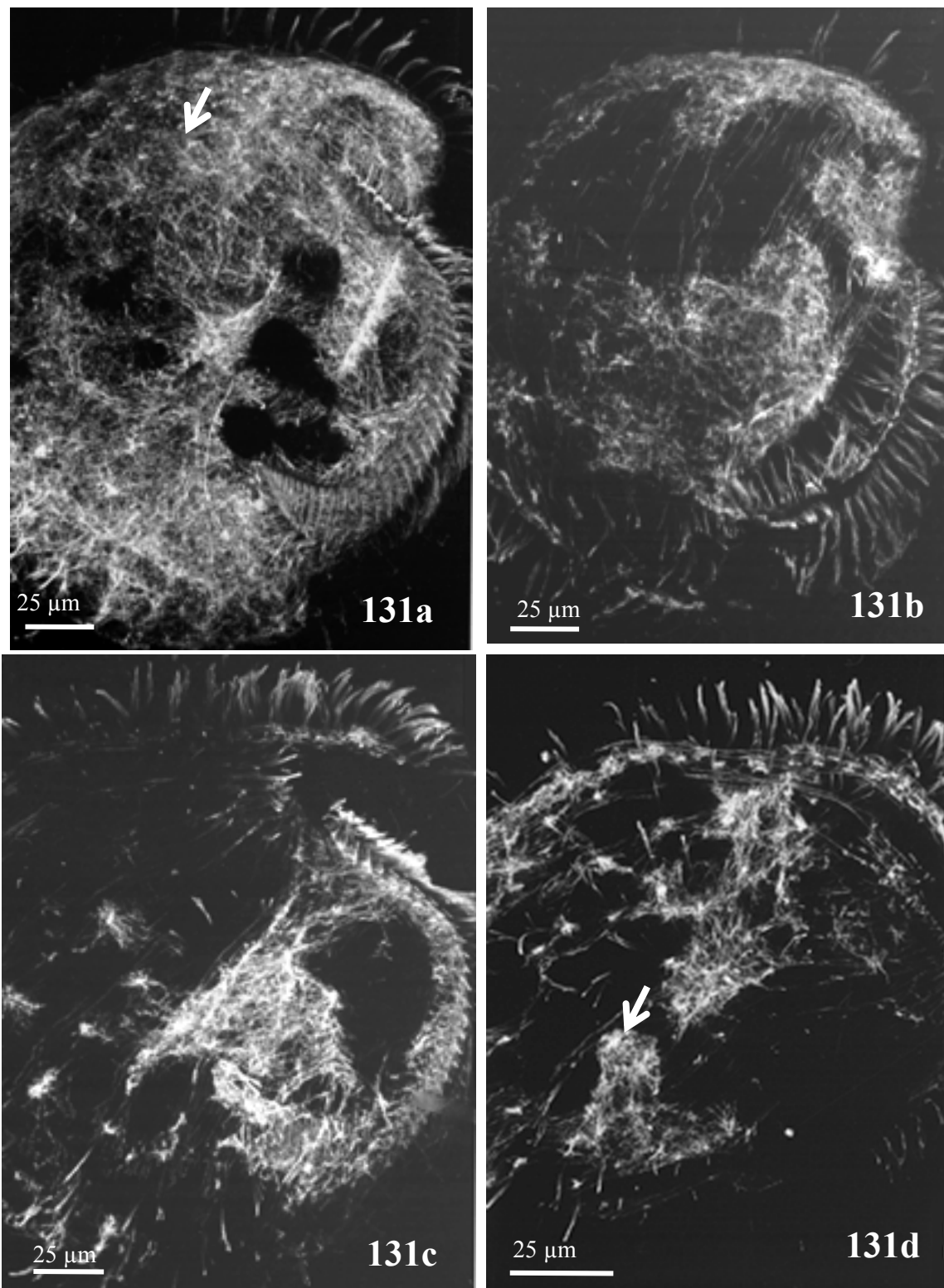




**Figs. 129a-d.** Anticuerpo TEU 318 (microscopía confocal). Red intracitoplásmica en una célula en los últimos estadios de la división. La flecha señala la zona ecuatorial, donde no se observa tinción por el anticuerpo de la red cortical longitudinal. **129 a y b.** Protero. **129 c y d.** Opisto, en lado derecho e izquierdo, respectivamente. PPa: primordio paroral.



**Figs. 130a-b.** Anticuerpo TEU 348: final de la división (microscopía confocal). **130a.** Protero. **130b.** Opisto: en la parte superior derecha se muestra la dotación macro y micronuclear. RL: red longitudinal cortical; S: infraciliación somática; PA: paroral.



**Figs. 131a-d.** Anticuerpo TEU 435 (microscopía confocal). Se observa la compleja red intracitoplásmica asociada a la infraciliación somática (flechas) totalmente desarrollada en los jóvenes tomites.



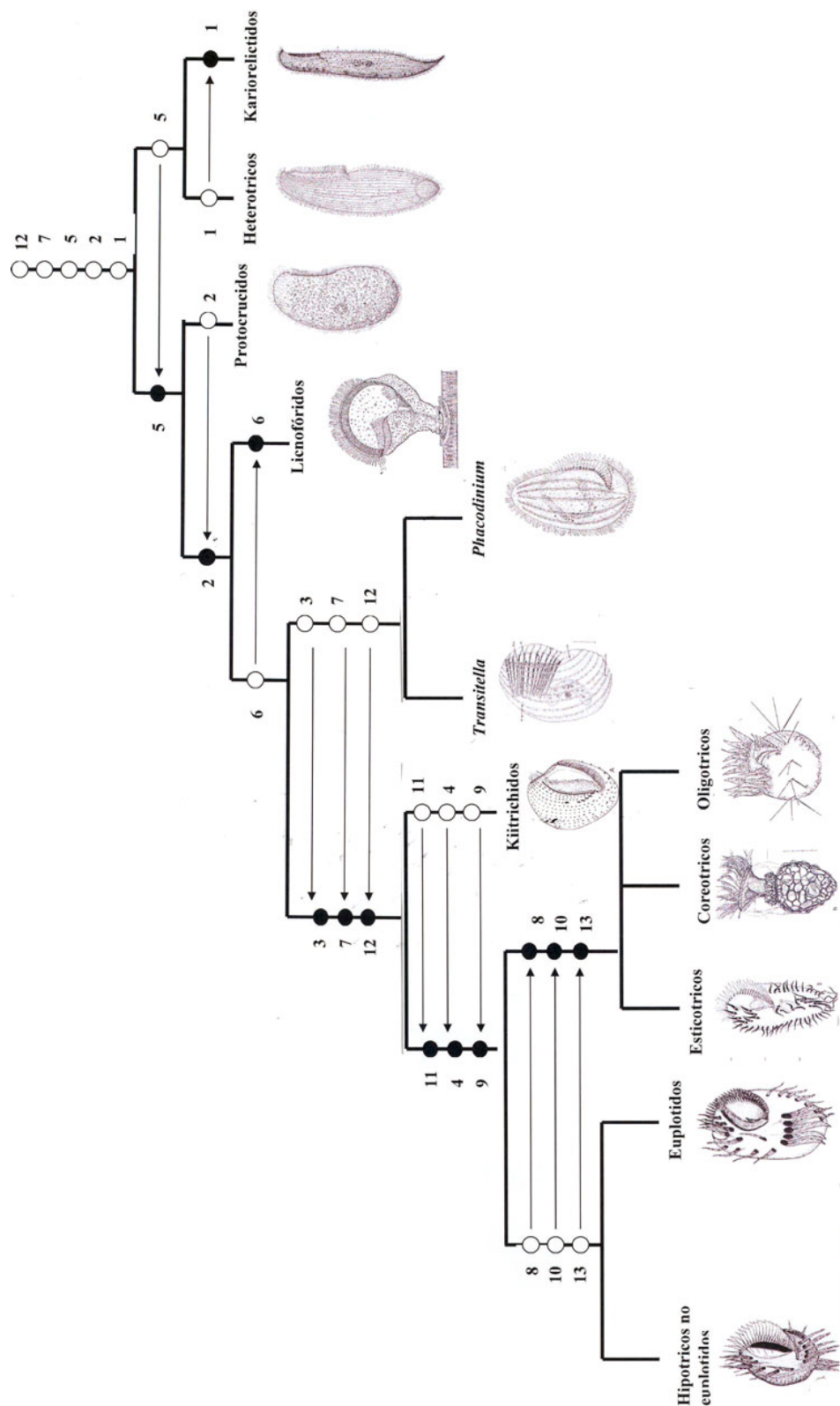


### 4.3. ANÁLISIS CLADÍSTICO

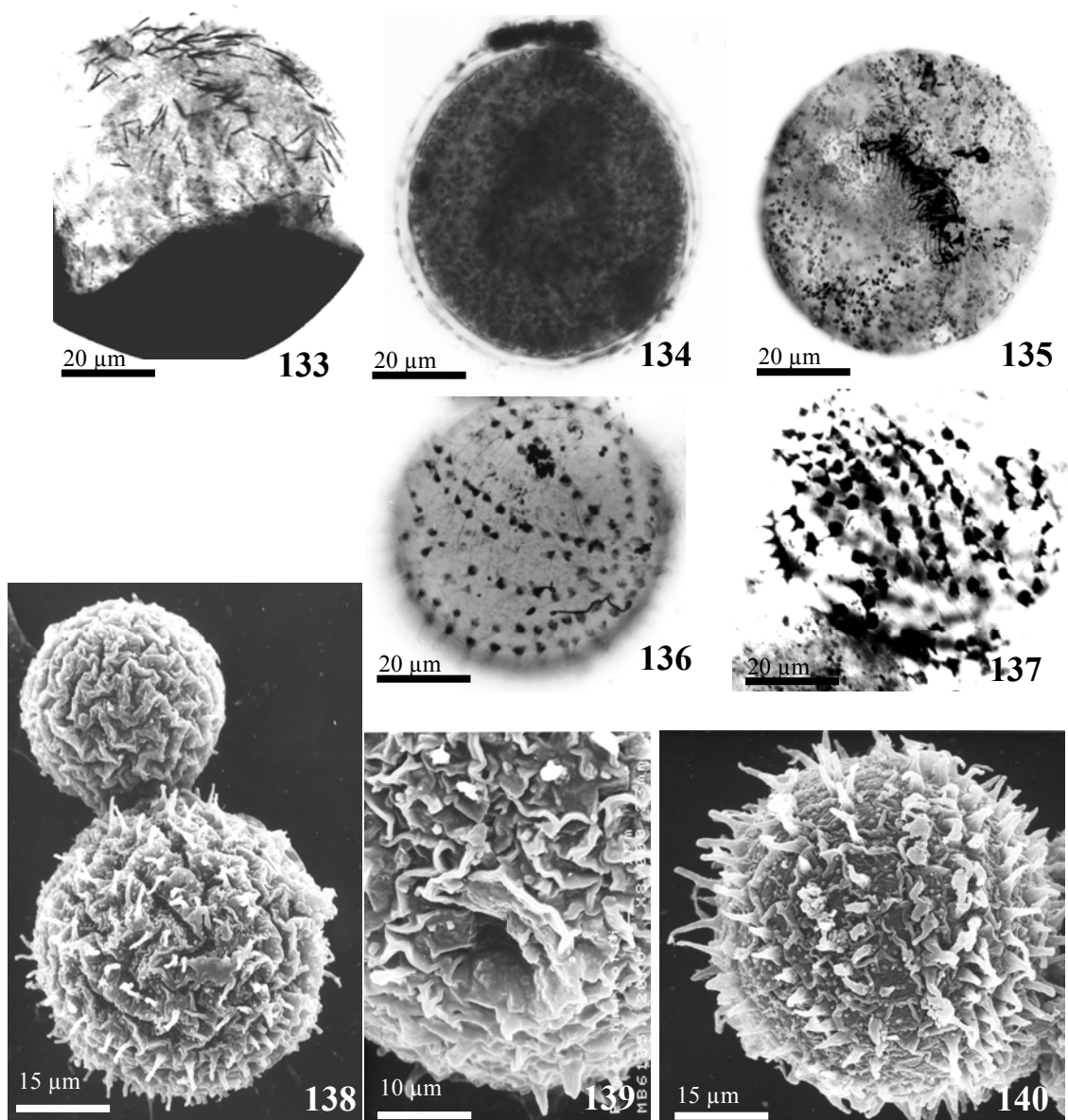
Una hipótesis sobre la potencial situación filogenética de *Phacodinium* puede plantearse en función de una serie de caracteres autapomórficos, infraciliares y ontogenéticos, que son los que, para muchos autores, definen grupos monofiléticos. Dichos caracteres se clasifican en plesiomórficos, si son primitivos, y caracteres apomórficos si son derivados (por consenso de los diferentes autores). De esta forma, se construye un árbol filogenético según los grupos/géneros comparten caracteres plesiomórficos (representados por círculos sin relleno) y éstos van derivando (sentido de flecha) en caracteres derivados (representados por círculos con relleno).

APOMÓRFICO	PLESIOMÓRFICO
1. Macronúcleo que no se divide	Macronúcleo que se divide
2. Dicinétidas con estructura típica de hipotricos	Dicinétidas con estructura típica de heterotricos
3. Cirros diferenciados	Pseudocirros o ciliación somática uniforme constituida por hileras de dicinétidas o policinétidas
4. Cirros en grupos distribuidos en zonas	Cirros en hileras
5. Macronúcleo con bandas de reorganización	Macronúcleo sin bandas de reorganización
6. Ciliación y forma celular especializados, ectocomensales con discos adhesivos	Generalmente no especializados, no comensales
7. Estomatogénesis apocinética	Paracinética
8. Estomatogénesis hipoapocinética	Estomatogénesis epiapocinética
9. Membrana paroral del opisto formada de novo junto con el primordio oral	Membrana paroral del opisto se origina del primordio paroral del protero
10. Filas de cirros marginales derechos	Sin cirros marginales derechos
11. Cirro frontal n°1 derivado del primordio oral	Cirro frontal n°1 no derivado del primordio oral
12. Cinetias dorsales con patrón de hipotrico	Cinetias dorsales con patrón de heterotrico
13. Patrón de división formado por cinco primordios FVT	No con este patrón

**Tabla IV.** Los datos se tomaron a partir de Berger (1999, 2006), Eigner y Foissner (1983), Foissner (1996), Song *et al.*, (2004).



**Fig. 132.** Esquema de la posible relación filogenética de los grupos estudiados según los datos de la tabla IV.



**Figs. 133-140.** Morfología de diferentes estadios quísticos con tinción argéntica (133-137) y MEB (138-140). **133-135.** Estadios de maduración del quiste. **136-137:** Quiste maduro. **138-140.** Diferentes ornamentaciones de la pared quística y detalle, en la fig. 139, del opérculo.



#### 4.4. QUISTE DE RESISTENCIA

Como ocurre en el ciclo celular de muchos protozoos ciliados, existe en *Phacodinium metchnikoffi* un ciclo facultativo de diferenciación celular conocido como ciclo de enquistamiento-exquistamiento. Este ciclo facultativo está conectado al ciclo crecimiento-división del ciliado y, cuando surgen en el medio las condiciones inductoras, la célula puede pasar de un ciclo al otro de forma reversible.

El factor inductor del enquistamiento fue la inanición: después de 1 hora, el 60% de las células aisladas (sin *Chlorogonium*) en una placa Petri con agua mineral comercial estaban en estado prequístico (sin espinas) y el 90% produjeron quistes de resistencia en 12 horas. No obstante, el enquistamiento también estuvo condicionado por la temperatura, de forma que el mayor porcentaje de células enquistadas se obtuvo a 37°C.

Las características morfométricas de los quistes se muestran en la tabla V:

Características	X	M	SD	CV	Min	Max	N
Longitud (con pared)	55.6	56	4,4	5,9	45	53	15
Anchura (con pared)	54	53,4	3,5	5,3	51	56	15
Grosor de la pared (nm)	1240	1290	330	25,6	780	1790	15
Longitud (con pared y espinas)	59,5	58	4,9	8,3	50	70	15
Anchura (con pared y espinas)	58,3	57,8	4,9	8,6	50	68	15

**Tabla V.** Datos morfométricos de los quistes maduros de *P. metchnikoffi* en MET.

##### 4.4.1. Cambios morfológicos

Al igual que en otros ciliados hipotricos como *H. muscorum* y *Pleurotrica sp.*, (Matsusaka y Kimura, 1981), se distinguen en *P. metchnikoffi* cinco tipos celulares morfológicos reconocibles durante el enquistamiento:

-En la fase 1, las células presentan las características morfológicas propias de una célula en su fase estacionaria: citoplasma de color marrón y aspecto granular. Al final de esta fase, cesan en su movimiento y se depositan en el fondo del recipiente donde se sitúan.

-En la fase 2, el citoplasma celular presenta un aspecto transparente como consecuencia de la excreción de productos de desecho al medio.

-En la fase 3, las células adquieren forma arriñonada.

-En la fase 4, se hacen esféricas, pero sin presentar pared quística alguna.

Después de estas cuatro fases, su volumen ha disminuido un 70% y ha desaparecido el material denso asociado a los cinetosomas y a la formación paroral.



-En la fase 5, las células presentan la pared quística en diferentes grados de maduración y en el quiste maduro la pared presenta espinas bien desarrolladas (figs. 133-140).

#### 4.4.2. Estructura y formación de la pared

En lo que se refiere a la estructura de la pared quística, se pueden distinguir en *Phacodinium metchnikoffi* las siguientes capas (figs. 140-146):

El **ectoquiste** presenta un grosor de 0,3  $\mu\text{m}$  y aparece en el conjunto de la pared como una capa fina electrodensa en contacto con el medio exterior. Presenta una estructura laminar constituida por pilas de placas en la parte más interna.

El **mesoquiste** tiene un grosor promedio de 4,5  $\mu\text{m}$  y, por tanto, es la capa de mayor grosor. Se trata de una capa de naturaleza fibro-granular menos electrodensa. Como ocurre en las especies *L. acumunata* y *P. wessei*, se pueden distinguir dos zonas: la zona externa de material fibrilar y la zona interna, constituida por material fibrilar estratificado.

El **endoquiste**, o tercera capa, es homogénea, tanto en la forma como en el grosor (sobre 0,4  $\mu\text{m}$ ), y está constituida por una sustancia amorfa granulosa muy compacta.

El **metaquiste**, capa granulosa de aspecto fibrilar, tiene un grosor muy variable y se localiza entre la membrana y el endoquiste.

Tanto la microscopia óptica como la electrónica revelan tres tipos de ornamentaciones en la pared quística:

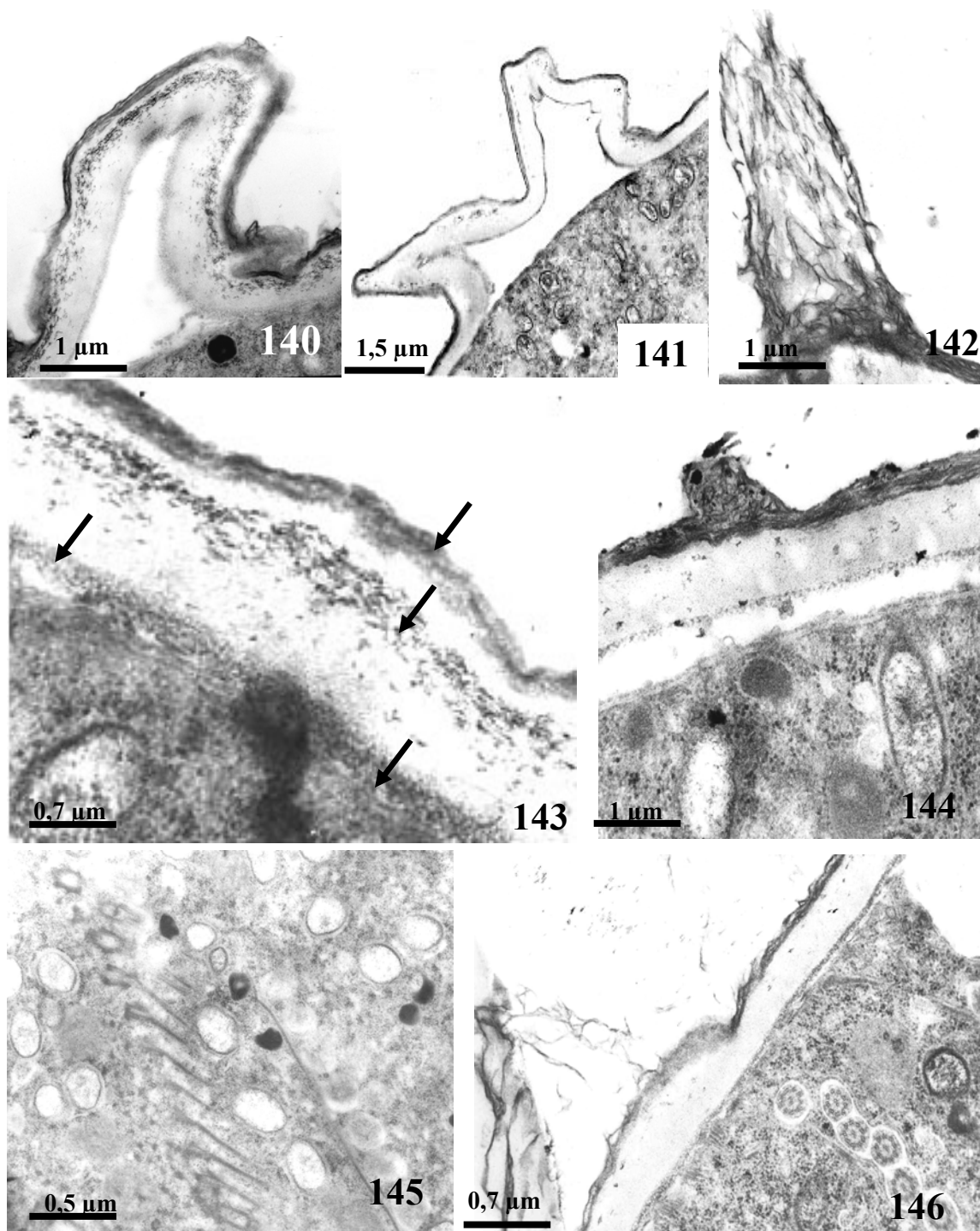
-Plegamientos: formados por ecto-, meso- y endoquiste, con una altura media de 200 nm y un ancho de 350 nm. La parte interna del pliegue está despegada del córtex celular.

-Protuberancias: son engrosamientos del ectoquiste.

-Espinass: están formadas por el material más externo del ectoquiste con forma de cono y aparecen en los quistes maduros dispuestas regularmente en filas, cuyo número medio es de 12. Presentan un espacio de separación con respecto a las placas más internas del ectoquiste. Su longitud es de 4,4  $\mu\text{m}$ .

Como en otros organismos, estas estructuras sirven tanto de adhesión del quiste al sustrato como de mecanismo de dispersión, al quedar adheridos al cuerpo de diferentes vectores.

En la pared quística aparece también un poro u opérculo que facilita la emergencia celular durante el exquistamiento (fig. 139).



**Figuras 140-146:** Estructura de la pared quística en MET. **140 y 141.** Plegamientos de la pared. **142.** Espina formada sólo por ectoquiste. **143.** Se distinguen claramente las cuatro capas de la pared (flechas). **144.** Protuberancia del ectoquiste. **145.** Derivados fibrilares asociados a los cinetosomas. **146.** Cilios en el citoplasma de la célula enquistada.



#### 4.4.3. Biogénesis de las paredes quísticas

Durante el enquistamiento, se pueden observar en las áreas corticales y orales de *P. metchnikoffi* gran cantidad de vesículas rodeadas de ergastoplasma, precursores de las diferentes capas de la pared quística, que se presentan como distintos tipos:

- Vesículas elipsoidales con material lamelar y granular. Aparecen poco después de la inducción al enquistamiento y son las precursoras del ectoquiste (fig. 148).

- Vesículas esféricas o elipsoidales rodeadas de membrana con grupos fibrilares. Son las precursoras del mesoquiste (fig. 150).

- Vesículas esféricas con material granular más electrodense, que se corresponde con las precursoras del endoquiste (fig. 149).

#### 4.4.4. Cambios corticales

Con respecto a los cambios en el corticotipo, y de acuerdo a las clasificaciones existentes, el quiste de *P. metchnikoffi* pertenece al tipo NKR (“non kinetosome resorbing cysts”), ya que ni se reabsorben cilios ni los derivados fibrilares somáticos en las células enquistadas. La ZAM aparece formada por paramembranelas muy empaquetadas y la formación paroral presenta sólo dos filas de cinetosomas, como ocurre durante la morfogénesis.

#### 4.4.5. Cambios citoplasmáticos

Un significativo cambio es la disminución del volumen celular (de un 70 a un 80% como en otros hipotricos) a consecuencia de la pérdida de agua intracelular. La deshidratación citoplasmática se produce a través de su vacuola contráctil (fig. 139) y tiene como finalidad conseguir el estado ametabólico. Debido a la pérdida de agua intracelular, se aprecian además una serie de cambios en los orgánulos celulares, que son los siguientes:

- Empaquetamiento y degeneración mitocondrial (fig. 149).

- Enriquecimiento del citoplasma en retículo endoplasmático rugoso y en ribosomas libres, ya que el enquistamiento es un proceso que depende de la síntesis de proteínas.

#### 4.4.6. Cambios nucleares

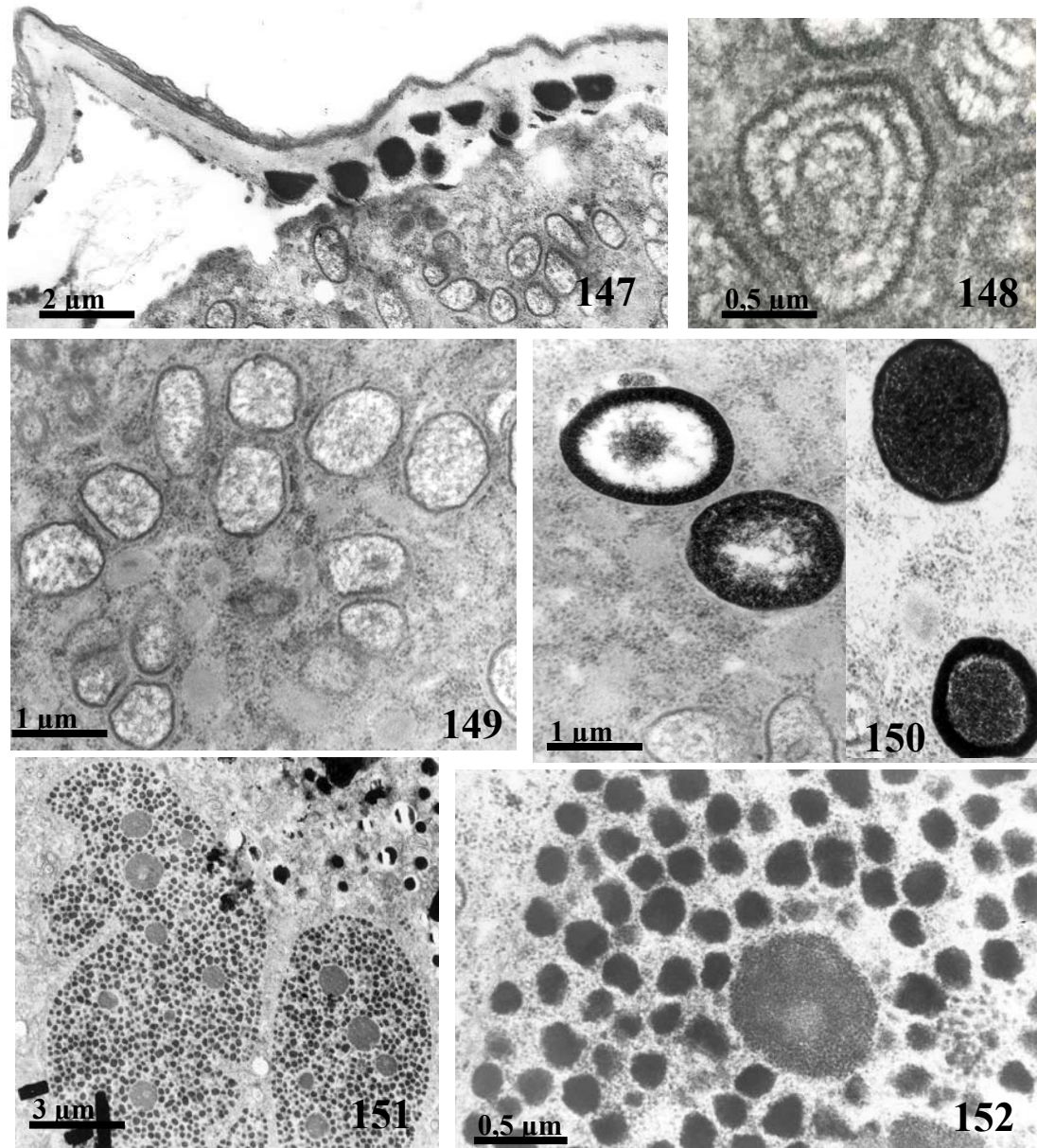
En estadios prequísticos (de 1 a 2 h.), el macronúcleo se repliega sobre sí mismo (fig. 151) y se produce la condensación cromatínica. Posteriormente, en el quiste maduro, el macronúcleo aparece redondeado (fig. 152).

En el estado quístico de *Phacodinium*, el número de micronúcleos se reduce a uno. Durante el exquistamiento, la dotación micronuclear de la célula se restituye por mitosis.





En cuanto a los nucleolos macronucleares, se observa un aumento de ellos en los estadios prequísticos (fig. 151). Posteriormente, el número se reduce durante la fase quística (fig. 152). No se observan cuerpos de extrusión.



**Figs. 147-150.** Precursores de la pared quística (MET). **147.** Incorporación de los precursores del endoquiste. **148.** Vesículas precursoras del ectoquiste. **149.** Vesículas precursoras del mesoquiste. **150.** Vesículas precursoras del endoquiste. **151.** Macronúcleo en estado prequístico con numerosos nucleolos. **152.** Macronúcleo en estado quístico.





## 4. 5. ANÁLISIS MOLECULARES

El objetivo de este apartado fue establecer la posición filogenética de *Phacodinium metchnikoffi* determinada por la caracterización molecular de los genes de ARNr 28S y de  $\alpha$ -tubulina. Para ello, la estrategia que se siguió fue la de la amplificación, clonación, secuenciación y análisis de los genes respectivos.

### 4.5.1. Secuenciación parcial del ARNr 28S

Como ya se comentó en el capítulo de introducción, el grupo francés dirigido por el profesor André Adoutte comenzó a utilizar, desde finales de los años 80, la secuencia del ARN ribosomal 28S para su aplicación en los estudios filogenéticos basados en datos moleculares. Este grupo determinó la existencia en la molécula de una región muy conservada, idónea para la valoración de las relaciones filogenéticas entre organismos eucariotas.

Por todo ello, en colaboración con dicho grupo, llevamos a cabo la secuenciación del ARN ribosomal 28S de *P. metchnikoffi* y su comparación con los datos existentes.

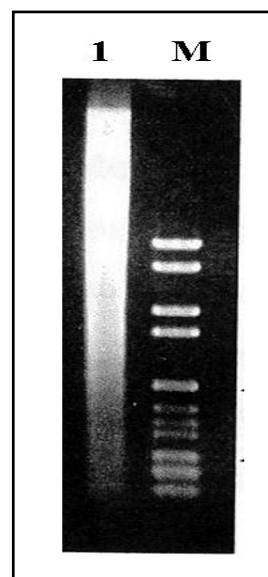
Seleccionamos un fragmento de aproximadamente 400 nucleótidos desde el extremo 5' de la molécula de ARN ribosomal de la subunidad grande, que contiene dos dominios muy conservados (C1 y C2), entre los cuales se encuentra una región más variable, de 150 nucleótidos (D1).

El ADN macronuclear de *P. metchnikoffi* fue detectado como una población continua de moléculas de amplio rango de tamaños génicos, como ocurre en la mayoría de los espirotricos.

Para la amplificación, utilizamos como cebadores tres oligonucleótidos complementarios de los segmentos 51-75, 278-302 y 382-404 sobre la secuencia génica de *Mus musculus*.

Entre los dos dominios conservados, existen 222 nucleótidos, que se alinean sin ambigüedad, de los cuales 122 presentan variaciones en los distintos organismos; y de estos últimos, 84 son filogenéticamente significativos.

En la secuencia del ARN 28S de *Phacodinium metchnikoffi* que se muestra a continuación, se señalan con un asterisco las posiciones en las que se ha encontrado una delección con respecto a la región terminal 5' del ARN 28S de ratón. Los dos dominios conservados utilizados para evaluar las distancias filogenéticas entre distintas especies aparecen subrayados, mientras que los nucleótidos que quedan entre ambos corresponden al dominio D1.



**Fig.153.** Carril 1: Control de ADN total de *Phacodinium metchnikoffi*. Carril M: Marcadores de tamaño molecular.



Registramos dicha secuencia en el banco de datos GenBank con el número de acceso AY554041.

5'

UGCACCUGAAAUCAAGUAAGAGCACCCGCUGAACUUAAGCAUAUUACUAA  
GCGGAGGAAAAGAAUUAACAAAGAUUGCCCUAGUAACGGCGAGUGAAC  
GGCAAAAGCCC\*AAAGUGUAAAUCUGUGGCAGUCUCUGCCACCGAAUUGU  
AAUCUAAAGGGGUAGGCUUAAAGACUAUGACGACGCAUAAGUCGCUAGGA  
AUGGCGCGCCAGAGAGGGUGAAAGCCCCGUUCAUGGCGUCGUCUGGUCUC  
GAGGUCGCCUUCAAGAGUCGGGUUGUUUUGUACUGCAGCCCUAAGUGGGA  
GAUAAACUUCUUCUAAGGCUAAAUAUUUACGGGAAACCGAUAGCAAACAA  
GUACUGUGAAGGAAAGAUGAAAAGAACUUUGAAAAGAGAG 3'

Tras obtener la secuencia, realizamos el alineamiento con otras de protistas, así como con la de la levadura *Sacharomyces cerevisiae* como grupo externo. Dichas secuencias fueron cedidas por A. Baroin. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Stylonychia	-----NNAT	4
Paraurostyla	-----NNAT	4
Halteria	-----GCAT	4
Urostyla	-----GTAT	5
Uronychia	-----GTAT	5
Euploaedicu	-----TGAT	4
Condyllostoma	-----GTGC	5
Stentor	-----GCGC	6
Isotricha	-----TGAC	5
Tetrahymena	-----ACAC	6
Tetrathermop	-----ACAC	6
Parameciumcau	-----ACAC	6
Colpoda	-----GCAT	5
Phacodinium	-----GCAC	5
Saccharomyces	-----TGAC	120
Stylonyc	CTGAAATCAAGCAGGATCACCCGCTGAACTTAAGCATATCACTAAGCGGAGGAGAAGAAA	64
Parauros	CTGAAATCAAGCAGGAGCACCCGCTGAACTTAAGCATATCACTAAGCGGAGGAGAAGAAA	64
Halteria	CTGAAATCAAGCAGGATCACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAAA	64
Urosty	CTGAAATCCAGCAGGATCACCCGCTGAACTTAAGCATATCACTAAGCGGAGGAAAAGAAA	65
Uronychia	CTGAAATCCAGTGAGAAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCACTAAGCGGAGGAAAAGAAA	65
Euploaedicu	CTGAAGTCAGGCAAGAGTACGCGCTGAACTTAAGCATATCACTAAGCGCGAGGAATTGAAA	64
Condyllostoma	CTGAACCTAAGCAAGGCTACCCGCTGGWCTTAAGCATMTTCATTACCGGAGGWAASAAA	65
Stentor	CTGAACCTAAGCAAGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATTACTAAGCGGAGGAAAAGAAA	66
Isotricha	CTGAAATT-AGTAAGATGACCCGCTGGACTTAAGCATATTACTAAGCGGAGGAAAAGAAA	64
Tetrapy	CTGATA-CAAGCAAGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAGTAAGCGGAGGAAAAGAAA	65
Tetrather	CTGAAA-CAAGCAAGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAGTAAGCGGAGGAAAAGAAA	65
Paracaudu	CTGAAATCAAGCAAGATCACCCGCTGAACTTAAGCATATCAGTAAGCGGAGGAAAAGAAA	66
Colpoda	CTGAAATCAGGCAAGATCACCCGCTGAACTTAAGCATATTACTAAGCGGAGGAAAAGAAA	65
Phaco	CUGAAAUCAAGUAAGAGCACCCGCGUAACUUAAGCAUAUUACUUAAGCGGAGGAAAAGAAA	65
Saccharo	CTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAA	180
	* * * * *	
Stylonyc	TTAACTAAGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCCCAAAATCTAAATCTA	124
Parauros	TTAACTAAGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGCGAAGCGGCAAAAGCCCAAAATGTAAATCTT	124
Halteria	TTAACTAAGATTGCCCTAGTAGCGGCNAGCGAAGCGGCAAGAGCCCAAACTGGAAATCTT	124
Urosty	TTAACTAAGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCCCAAAATGGTAATCTT	125
Uronych	TTAACTAAGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGCGAAGCGGCAAAAGTCCAAACTGTAAATCTC	125
Euploaedicu	T-AACTATGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCCCAAGATGAAATTCG	123
Condyllos	CTAACCAGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCCCACTGGAAATCG-	124
Stentor	CTAACAAGGATTACCTTAGTAACCTGCGAGTGAAGTGGTAAAAGCCAGACTGGTAATCG-	125
Isotrich	TTGACGAAGATTGCCTTAGTAAGGGCGACTGAACCGGCAAAAGCTCGAAATTGAAATCGT	124
Tetrapy	CTAACTAGGATAGCCCCAGTAATGGCGAATGAACAGGCTAAAGCTCAAAGTGAAATCTG	125
Tetrather	CTAACTAGGATAGCCCCAGTAATGGCGAATGAACAGGCTAAAGCTCAAAGTGAAATCTG	125



Paracaudu	CTAACAAGGATTGCCTTAGTAGTGGCGAATGAACCGGCATCAGCTCAAAGTGTAATCTG	126
Colpoda	TTAACGAAGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAATAGCTCAAGTTTGAATCTG	125
Phaco	UUAACAAAGAUUGCCCUAGUAACGGCGAGUGAACC GGCAAAAGCCAAAGUGUAACUG	125
Saccharo	CCAACC--GGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTG	239
	* * * * *	
Stylonyx	GT--ACATTCTGTACTCGAATTGTAATCTAGAGAGGATTCACTCAACGGGT--GGTGGCGC	181
Parauros	GTGCACATCGTGTACACGAATTGTAATCTAAAGAGAGTTCACTCAACGGGC--GGTGGCGC	183
Halteria	GCGTACCCCGTGCACGCAATTGTAATCTAAAGGATGTTCACTCAAGGNNAGGTGGCGC	184
Urosty	----MCTTTCAGGTGACGAATTGTAATCTACAGGTGGGATACTCAACTGGA--GGTGATGC	180
Urorych	TG--GTTTTCGGCCAGCGAATTGTAATCTACAG--TGGTGCCTGACAAGTGAGGTGGTGC	182
Euploaedicu	TGTCCTTTGGACGCGAAGAATTGTAATCTATAGAGCAGTCGCTGACAGATGCTTGAAG	183
Condylos	-----CTTCGG----CGAGTTGTACAGKGAACCGTAGCTCTAGCGSAAGGCGGCTCT	174
Stentor	-----CTTCGG----CGAATTGTACAGTTTAGACATGTGTCTTAAGTGAATCG--CACGC	174
Isotrich	TG---ATTCAA--AGAATCTTCTGAATTGTAATCNGGCAAGCCAAAATACGGATAATAT	178
Tetrapy	GA-----AACAGAATTGTAATCTAAAGAGTTAACCCTA--AAGCTAAGCTCCTCTG	173
Tetrather	AAGTGGTCAACACACGAATTGTAATCTAAAGGGTCAACCTG--AACTAAGCTCCTCTC	184
Paracaudu	AGGCATCAAG--TCTTAGAATTGTAATCTATAGGCCTTTTAGGGAAGTCACGGTCTCTAG	184
Colpoda	TAGTCGTCTCGGCTACCGAATTGTAATCTAAAG--GGGTAACTAAAGGGGAAGTTGAGG	184
Phaco	UGGCAGUCUCUGCCACCGAAUUAUUAAGGGGUGAGCUUAAGACUAUGACGACGC	185
Saccharo	GT--ACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCACTTTGGGGCCGTTTCT--CTTGT	296
	*	
Stylonyx	-AGAAGTGACCACGAACGGTCCGCCAGAGAGGGTGAAAGCCCCGTA-TGTGGT--GCCGC	237
Parauros	-AGAAGTGACCTCGAACGGTCCGCCAGAGAGGGTGACAGCCCCGTA-TGTGGT--GTCAC	239
Halteria	CAGAAAGTGTCTTTCNAACGGACGCGCAGAGAGGGTGCCAGCCCCGTA-TGTGGT--GCCAC	241
Urosty	-AGAAGTACCCTAGAACGGGTCCGCAAGAGGGTGACAGCCCCGTA-TGTGGT--GTCGC	236
Urorych	-ATAAGTGCTTGGCATAGGCCGCCAGAGAAGTAAACAGCCCTGTC-TTTGGT--GCCAG	238
Euploaedicu	-TCAAGTGCTTGGAAATGGACGCCATGGAGGGTGAAAGCCCCGTA-CGGCATCGAGGAG	241
Condylos	-GTAACCTTCCCTTGGMMCAGGAGACCCAGAGAGAGTGATAGTCCCA---GTSCGAGGGCTAG	230
Stentor	-GTAACCTTGGCTGGAATGCCAGACCGGAGAAGGTGATAGTCTG---TGCCGCTGT--G	228
Isotrich	-CTTAACAAGGTGCAATCCTTGCCCATAGAGAGTGAGAGCCTCGTGTNGTATT-----G	231
Tetrapy	-ATAAGTTCCCTTGGAACAGGACGTCAAAGAGGGTGACAACCCCCGTA-GTCGGTGAGGAAT	231
Tetrather	-ATAAGTTCCCTTGGGACAGGACGTCAAAGAGGGTGACAACCCCCGTA-GTCGGAGAGGAAG	242
Paracaudu	-ATAAGTTCTTGTAAAAGGAATGCCAAAGAGGGTAAAAGCCCCGTA-TTTGGTTAGGACT	242
Colpoda	-ATAAGTTCCCTTGGAACAGGACGTCAAAGAGGGTGAAAACCCCCGTA-TGCAGCC--TCCGC	241
Phaco	-AUAAGUCGCUAGGAUUGGCGGCCAGAGAGGGUGAAAGCCCCG---UUCAUGCGGUCGU	241
Saccharo	-CTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCTATAGAGGGTGAGCATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCG	355
	* * * *	
Stylonyx	TACTTAACGAGTGGGTTTTTCGAAGAGTCGGGTTGTTTTGTATTGCAGCCCTAAGTGGGAG	297
Parauros	CGCTTAACGAGTGGGTTCTTAACGAGTCGGGTTGTTTTGTATTGCAGCCCTAAGTGGGAG	299
Halteria	CGCCTAACGAGTGGGTGTTCAACGAGTCGGGTTGTTTTCTATTGCAGCCCTAAGTGGGAG	301
Urosty	CTCCTAACGAGTAC--CTTTCGAAGAGTCGGGTTGTTTTGGAAATGCAGCCCTAATTGGGAG	295
Urorych	CTTACTCTAAGTGTGCATACGAGAGTCGGGTTGTTTTGTACTGCAGCCCTAATTGGGAG	298
Euploaedicu	GTTCTAAGTGGTGGCTGTTTGAAGAGTCGAGTTGTTTCGGGACTGCAGCTCTAAGTGGGAG	301
Condylos	CTGATCGATAGAGCGCGTCTTAAGAGTCRRGTAGTTTGGGATTGCTGCCCTAAGCGGGAG	290
Stentor	TGAAGCGAAAGACTGTGTTC--AAGAGTCGGACAGTTTGGGATTGCTGTCTAAGTGGGAG	287
Isotrich	TCCGGAACNGGGGTGTACACAGAGTCGGGTTGCTTNGAACTGCAGC--CTAAGCGGGAG	290
Tetrapy	GCTGGTGAAGGGAAGGCTTCAAAGAGTCGGGTTGTTTGGGATTGCAGCCCTAAGTGGGAG	291
Tetrather	GCTGGTGAAGGGAAGGCTTCAAAGAGTCGGGTTGTTTGGGATTGCAGCCCTAAGTGGGAG	302
Paracaudu	G--GATGTACCGAAGGGTTCCAAGAGTCGGGTTGTTTGGGATTGCAGCCCTAAAATGGGAG	300
Colpoda	TGAACCGACAGTTGGCTTCTAAGAGTCGGGTTGTTTGGGATTGCAGCCCTAAACGGGAG	301
Phaco	CUGGUCUCGAGGUCGCCUUC--AAGAGUCGGGUUUUUUUGUACUGCAGCCCUAAGUGGGAG	300
Saccharo	GTTCTTTGTAAAGTGCCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTG	415
	* * * * *	
Stylonyx	ATAAACTTCTTCTAAGGCTAAATATATATGGGAAACCGATAGCGAACAAGTACTGT----	357
Parauros	ATCAACTTCTTCTAAGGCTAAATATATATGGGAAACCGATAGCGAACAAGTACTGT----	359
Halteria	ATAGACTTCTTCTAAGGCTAAATATATATGGGAAACCGATAGCGAACAAGTACTGT----	361
Urosty	ATACACTTCTTCTAAGGCTAAATATGTATGGGAAACCGATAGCGAACAAGTACTGT----	351
Urorych	ATAAACTTCTTCTAAGCTAAATACTCGTGGGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGT----	358
Euploaedicu	GTAGACTTCTTCTAAGGCTAAATACTATGAGAGACCGATAGCGAACAAGTAAATGT----	361
Condylos	GTAGACTTCTTCTAAGGCTAAATATTAACGAGAGACCGATAGTGGAACAAGTACTGT----	350
Stentor	GTAGACTTCTTCTAAGGCTAAATACTGACGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGT----	347
Isotrich	ATATGAATCTTCCAAAGCTAAATATGGATGGGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGT----	350
Tetrapy	ATAAACTTCTTCTAAGCTAAATATACACGGGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGC----	351
Tetrather	ATAAACTTCTTCTAAGCTAAATATACACGGGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGC----	362
Paracaudu	ATAAACTTCTTCTAAGCTAAATATTTATGGGAAACCGATAGCAAACAAGTACTAC----	360
Colpoda	ATAAACTTCTTCTAAGGCTAAATATCTATGGGAAACCGATAGCGAACAAGTACTGT----	361
Phaco	AUAAACUUCUUAAGCGUAAAUUUUACGGGAAACGCAUAGCAAACAAGUACUGU----	360
Saccharo	GTAATTTCCATCTAAAGCTAAATATTTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTAGT----	475
	* * * * *	

Seguidamente, llevamos a cabo el análisis estadístico (véase el capítulo III “Materiales y Métodos”) para obtener el número de variaciones en la secuencia de



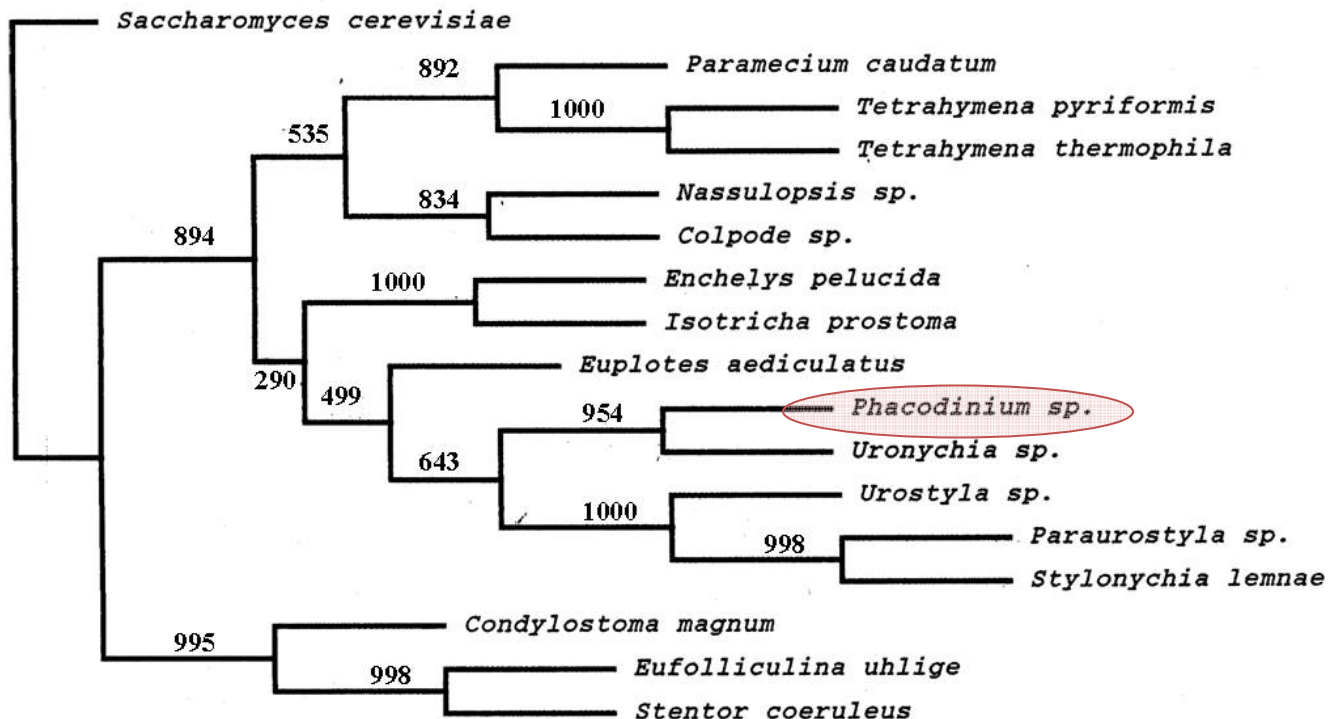
nucleótidos. Dicho valor transformado, una vez aplicada la corrección de Kimura, aparece en la siguiente tabla:

	Colpo	Condy	Enche	Eufol	Euplo	Isotr	Nassu	Param	Parau	Phaco	Stent	Stylo	Tetra	Tetra	Urony	Urost	Sacch
<i>Colpode sp</i>	0.00																
<i>Condylosto</i>	22.68	0.00															
<i>Enchelys p</i>	19.90	27.06	0.00														
<i>Eufollicul</i>	26.20	18.56	28.21	0.00													
<i>Euplotes a</i>	19.85	25.90	23.12	25.56	0.00												
<i>Isotricha</i>	20.96	27.13	13.99	28.79	26.20	0.00											
<i>Nassulopsi</i>	12.66	23.00	21.46	25.76	20.91	21.52	0.00										
<i>Paramecium</i>	16.16	25.58	20.00	24.75	23.17	23.35	16.20	0.00									
<i>Paraurosty</i>	16.08	25.45	19.24	26.38	19.10	21.63	16.88	18.43	0.00								
<i>Phacodiniu</i>	15.33	24.10	19.10	23.81	18.34	21.66	15.87	16.37	13.32	0.00							
<i>Stentor co</i>	23.23	16.54	25.76	11.36	24.87	26.08	23.54	23.54	23.43	20.10	0.00						
<i>Stylonychi</i>	15.15	24.81	18.32	26.01	19.19	20.97	16.71	17.77	2.55	12.63	23.04	0.00					
<i>Tetrahymen</i>	15.62	22.16	20.71	23.17	22.11	22.28	16.67	13.92	17.38	17.59	21.46	17.47	0.00				
<i>Tetrahymen</i>	16.12	22.68	20.71	23.93	22.61	21.77	17.17	14.43	17.63	17.59	22.22	17.72	1.77	0.00			
<i>Uronychia</i>	17.63	24.94	23.17	27.64	19.90	24.05	18.43	20.96	14.90	11.84	23.93	15.48	20.15	19.90	0.00		
<i>Urostyla s</i>	15.08	24.16	19.75	25.63	19.35	20.36	17.63	19.44	7.11	14.82	22.42	7.40	17.88	17.88	16.16	0.00	
<i>Saccharomy</i>	21.61	22.82	26.38	28.82	25.56	27.96	21.91	24.94	24.31	22.56	25.88	24.43	21.36	22.36	24.37	24.06	0.00

**Tabla V.** Matriz calculada de acuerdo con todas las diferencias en los pares de bases de las distintas secuencias de ARNr 28S, en la que figuran los diferentes valores “Knuc”.

#### 4.5.2. Árboles filogenéticos para el ARNr 28S

Con estos valores construimos un dendograma según el método “Neighbour-Joining”, cuyos resultados se muestran a continuación:



**Fig. 154.** Árbol filogenético basado en la comparación de secuencias del extremo 5' del ARNr 28S. La escala representa un porcentaje de 3.78 de sustituciones por posición. En cada nodo se marcan los valores de “bootstrap” obtenidos por el análisis de “Neighbor-Joining”. La distancia entre dos especies es proporcional a la suma de las proyecciones en el eje “x” (“Knuc”) de las longitudes de las ramas. Las distancias en el eje “y” son arbitrarias.



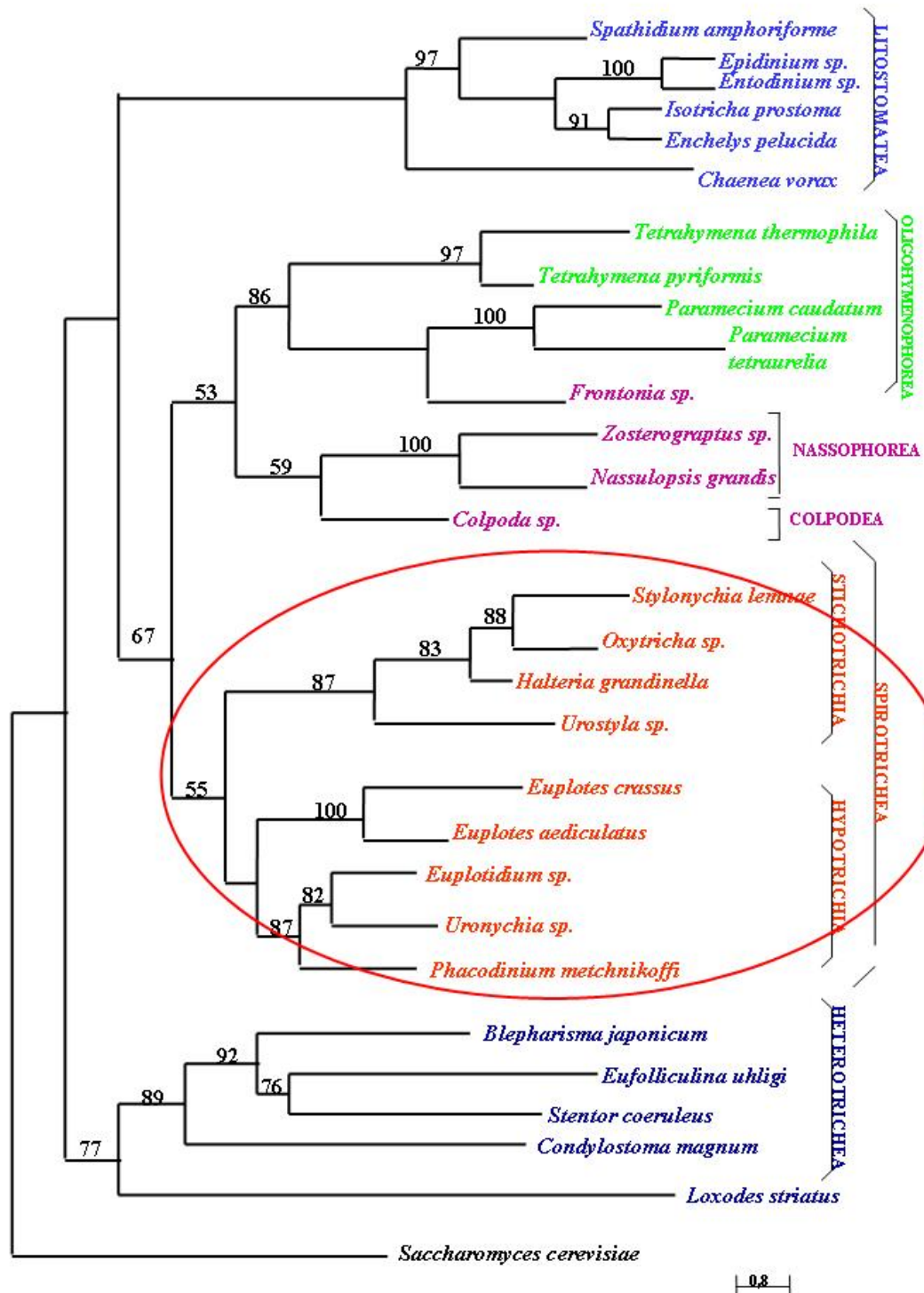
En una primera interpretación de este árbol, destacan algunos resultados muy generales, que coinciden con los obtenidos con otros marcadores moleculares utilizados en filogenia, como es que los protistas se segregan claramente de otros microorganismos eucariotas, caso de la levadura *S. cerevesiae*; o que, dentro de los protistas, los ciliados heterotricos aparecen formando un grupo robusto separado del resto de los ciliados.

Este grupo restante de ciliados, con valores elevados de “bootstrap”, presenta a su vez dos subgrupos:

- Un grupo sólido constituido por dos subgrupos de ciliados bien diferenciados: por un lado, oligohimenoforos y, por otro, nasoforeos y colpodidos.

- Un segundo grupo débilmente atrapado, pero que incluye dos clados: los litostomos y los espirotricos, grupo en el que aparece sólidamente establecido *Phacodinium*.

Posteriormente, realizamos un árbol filogenético más completo, al que incorporamos las especies cuyas secuencias de ARNr 28S figuraban en el banco de datos y otras cedidas por Anne Baroin. El árbol resultado de dicho análisis fue el siguiente:

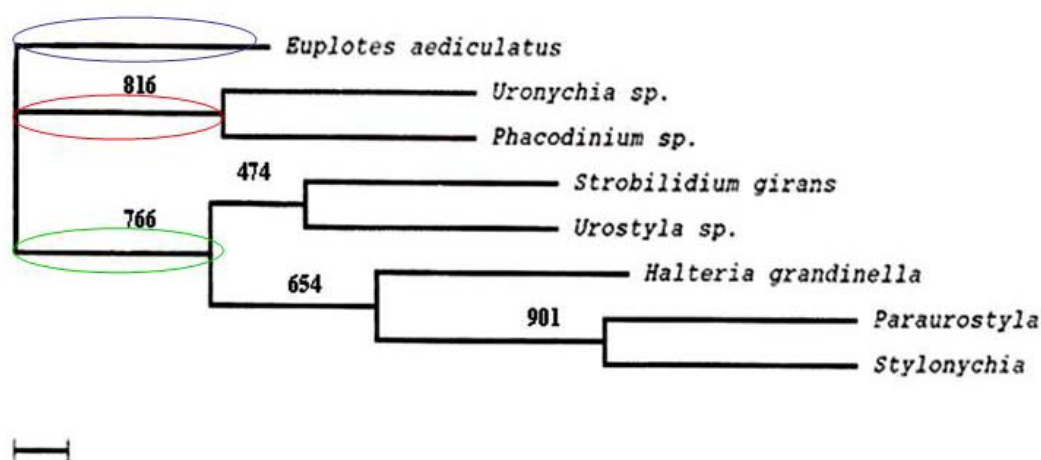


**Fig. 155.** Árbol filogenético de los ciliados realizado por el método de “Neighbor-Joining”. El análisis se restringe al extremo 5’ de la molécula de ARNr 28S. Entre los 267 sitios que se alinean sin ambigüedad, 171 son variables y son los que se tienen en cuenta para el análisis filogenético. La barra de escala representa el 1% de sustituciones de nucleótidos.



Los resultados muestran que el grupo de los heterotricos es bastante robusto –de hecho, su monofilia aparece sólidamente establecida en más del 89% de los casos- y también indican que a su vez está asociado con los kariorelicteos (*Loxodes striatus*), de forma que sistemáticamente su radiación precede a la de espirotricos-oligohimenoforos-litostomos. Por otro lado, en la radiación de este nodo, y en los que respecta a los espirotricos, se observa la clara segregación de las subclases Hypotrichia y Stichotrichia, o según Fleury (1988), pseudohipotricos y euhipotricos, respectivamente. De nuevo, *Phacodinium* ocupa la posición basal en la subclase Hypotrichia.

Por último, se realizó un nuevo análisis de parsimonia, sólo para la clase de los espirotricos. El resultado obtenido fue el siguiente:



**Fig. 156.** Árbol calculado con el método de matriz de distancia. Los espacios que aparecieron en la secuencia de los dominios seleccionados se trataron como una quinta base. La escala se corresponde con 2,16% sustituciones de nucleótidos.

De las ramificaciones que muestra el árbol se corrobora que:

-Que la rama que conduce a los euplotidos (en azul) es independiente de las demás y no mantiene ningún nodo de asociación con el resto de espirotricos.

-Que la rama formada por *Uronychia* y *Phacodinium* (en rojo) está solidamente constituida y aparece siempre en la base de los espirotricos.

-Que los oligotricos se segregan junto con el resto de los esticotricos (en verde).

Sin embargo, el grupo de los espirotricos aparecía como parafilético, por lo que era necesario realizar nuevas aportaciones de secuencias para resolver el orden de aparición de las distintas subclases. Para ello, llevamos a cabo la secuenciación del gen de la  $\alpha$ -tubulina.

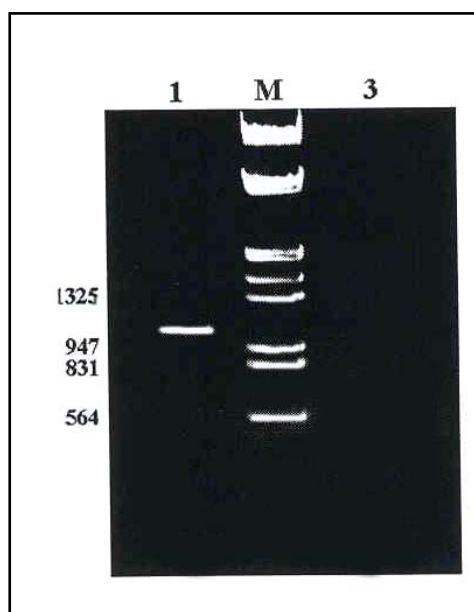


#### 4.5.3. Secuenciación parcial del gen $\alpha$ -tubulina

Aunque las tubulinas constituyen una familia multigénica, la duplicación de genes no parece constituir un problema para el análisis filogenético. En los ciliados, a pesar de la diversidad en el citoesqueleto microtubular, tanto la  $\alpha$  como la  $\beta$ -tubulina están codificadas por un número pequeño de genes. En los diferentes análisis se muestra que la diferencia entre las diferentes isoformas no es tan grande como para perturbar las relaciones entre especies próximas. Por ello, se realizó la amplificación, clonación, secuenciación y análisis de la secuencia de  $\alpha$ -tubulina del ciliado objeto de este estudio para su comparación filogenética.

Para la amplificación, se utilizó la pareja de oligonucleótidos degenerados NT<sub>2</sub> y CT<sub>2</sub>. Las secuencias nucleotídicas de estos cebadores se obtuvieron a partir de las secuencias de aminoácidos referidas a la  $\alpha$ -tubulina de *Tetrahymena pyriformis* CLHGIQ (posiciones 25-31) y MEEGEF (posiciones 413-418).

Tras la amplificación del ADN total de *Phacodinium metchnikoffi* por PCR, se obtuvo un amplicón de 1.0 kb (localizado entre las posiciones 1.375 y 947 kb del marcador).



**Fig. 157:** Electroforesis en gel de agarosa de la reacción de amplificación de  $\alpha$ -tubulina. Carril 1: Amplificación con ADN total de *P. metchnikoffi*. M. Marcador de tamaño  $\lambda$  *EcoRI/HindI*. Carril 3: Control sin ADN. Los números del margen indican el tamaño de los fragmentos del ADN del marcador.

El ADN del amplicón se extrajo de la agarosa y se clonó en pGEM-T (Stratagene). El fragmento amplificado presentaba un tamaño de 1.024 nucleótidos (83,75% de la secuencia codificante de un gen estándar de  $\alpha$ -tubulina) y no contenía inserciones.

En la siguiente figura se muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento del gen de  $\alpha$ -tubulina obtenido para *Phacodinium metchnikoffi*. Dicha secuencia se registró en el banco de datos de GenBank con el número de acceso AY554040.





NT2 ►

1 agggcggaatt gggccgacgt cgcattgctcc cggccgccat ggccgcggga

51 ttgtattcaa ccaGATGGAC AAATGCCCTC AGACAAAACCT ATCGGAGGAG

101 GAGATGATGC GTTCAACACC TTCTTTTCTG AAACCTGGTGC AGGAAAGCAC

151 GTTCCAAGAG CAGTCTTCCT TGATCTCGAG CCTTCAGTCG TTGATGAAGT  
P R A V F L D L E P

201 CAGGACAGGA ACATACAGAC AACTATTCCA CCCCAGACAA CTCATCTCCG

251 GAAAGGAAGA TGCCGCAAAC AATTTTCGAA GAGGACACTA CACAATTGGA

301 AAAGAAATCG TTGATCTCTG CCTTGATAGA ATCAGAAAGT TGCGAGACAA

351 CTGCACAGGA CTCCAAGGTT TCCTCGTCTT CAACGCAGTC GAGAGAGGAA  
G G G

401 CAGGATCAGG ACTCGGCTCT CTCCTTCTTG AAAGACTCTC AGTCGACTAT  
T G S G

451 GGCAAAAAGT CAAAGCTCGG ATTCACCATC TACCCGTCTC CCCAGATCTC

501 AACTGCAGTT GTTGAACCAT ACAACTCAGT GCTCTCAACT CACTCACTCC  
A V V E P Y N

551 TCGAACATAC CGATGTTGCA GTTATGCTCG ACAACGAAGC TGTTTATGAC

601 ATATGCAGAA GAAATCTCGA CATCGAAAGA CCCACATACA CCAACCTGAA

651 CAGACTCATT GCTCAAGTCA TCTCATCCCT CACAGCCTCC CTCAGATTCTG  
R F

701 ACGGAGCACT CAACGTTGAT GTCACAGAAT TCCAAACAAA CTTGGTGCCA  
D G A L

751 TACCCAAGAA TTCACTTCAT GCTTTCATCA TACGCCCCAA TCATCTCAGC

801 AGAGAAGGCT TACCACGAAC AACTCTCCGT TGCCGAAATC ACCAACAGCG

851 CCTTCGAACC AGCATCAATG ATGGCAAAAT GTGACCCAAG ACACGGAAG

901 TACATGGCAT GCTGCATGAT GTACAGAGGA GATGTAGTCC CAAAGGATGT

951 TAATGCAGCC GTTGCAACCA TTAAGACAAA GAGAACCATC CAATTCGTCTG

1001 ACTGGTGCCC AACAGGATTC AAGTGCGGAA TTAACACCA ACCACCAACA

1051 GTCGTCCCAG GAGGAGACTT AGCAAAGGTC ATGAGAGCAG TTTGCATGAT

1101 CTCCAACCTCC ACTGCCATCG CAGAAGTCTT CTCAAGAATC GACCACAAGT

1151 TCGATCTCAT GTACGCAAAG AGAGCCTTCG TTTACTGGTA CGTCGGAGAA

1201 GGAatggaag aaggagagtt ctgaatcact agtgcggccg cctgcaggtc

1251 gaccatatgg gagagctccc aacgcgttgg atgcatagct tgagtattct

1301 atagtgtcac ctaaataagct ◀ CT2

**Fig. 158.** Secuencia nucleotídica del fragmento de ADN que codifica para la  $\alpha$ -tubulina de *P. metchnikoffi*. Se señalan en azul los cebadores NT2 y CT2; y en rojo, aparecen los dominios de unión a GTP. Las flechas indican la dirección de polimerización.



En la secuencia aparecen cuatro sitios de unión a GTP:

-PRAVFLDLEP (aa. 62-72) y RFDGAL (aa. 243-248), ambos implicados en la unión a la base púrica.

-GGGTGSG (aa. 142-148), relacionados con la unión a la ribosa.

-AVVEPYN (aa. 180-186), implicado en la unión al fosfato.

No existen intrones en la secuencia amplificada para  $\alpha$ -tubulina. Tampoco aparecen codones UAA, UGA ni UAG en fase de la lectura, por lo que no tienen lugar desviaciones del código genético en esta secuencia, como se dan, en cambio, en otros ciliados.

El contenido de G + C es del 44,37 mol %.

De los 61 codones existentes, se han encontrado 53 en la secuencia, de los cuales tres son codificados por un solo codon: met/ATG, trp/TGG y arg/AGA.

GGG: gly 0	GGA: gly 25	GGT: gly 2	GGC: gly 2
GAG: glu 3	GAA: glu 15	GAT: asp 13	GAC: asp 11
GTG: val 2	GTA: val 1	GTT: val 14	GTC: val 15
GCG: ala 1	GCA: ala 19	GCT: ala 3	GCC: ala 8
AGG: arg 1	AGA: arg 18	AGT: ser 0	AGC: ser 1
AAG: lys 14	AAA: lys 4	AAT: asn 3	AAC: asn 13
ATG: met 11	ATA: ile 1	ATT: ile 5	ATC: ile 15
ACG: thr 0	ACA: thr 12	ACT: thr 5	ACC: thr 7
TGG: trp 2	TGA: fin 0	TGT: cys 1	TGC: cys 8
TAG: fin 0	TAA: fin 0	TAT: tyr 2	TAC: tyr 13
TTG: leu 2	TTA: leu 1	TTT: phe 1	TTC: phe 17
TCG: ser 0	TCA: ser 15	TCT: ser 3	TCC: ser 6
CGG: arg 0	CGA: arg 0	CGT: arg 0	CGC: arg 0
CAG: gln 1	CAA: gln 9	CAT: his 1	CAC: his 9
CTG: leu 1	CTA: leu 1	CTT: leu 5	CTC: leu 20
CCG: pro 1	CCA: pro 13	CCT: pro 1	CCC: pro 4

**Tabla VI.** Uso de los codones en el fragmento amplificado de la  $\alpha$ -tubulina de *P. metchnikoffi*. Se indica el número total de presencias de cada codon en la secuencia. Aparecen sombreados aquellos con mayor frecuencia de aparición.

#### 4.5.3. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la $\alpha$ -tubulina de *P. metchnikoffi* con la de otros ciliados.

La secuencia de aminoácidos de *Phacodinium metchnikoffi*, deducida a partir de la secuencia de nucleótidos, y su alineamiento con distintas secuencias de  $\alpha$ -tubulina de otras especies de ciliados, obtenidas de la base de datos del GenBank (véase el capítulo III “Materiales y Métodos”), son los siguientes:



Pmetub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED
Euoctotub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED
Euaeditub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED
Euvantub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED
Styleltub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED
Stylertub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED
Oxytritub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED
Hcavtub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED
Halgratub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED
Strombtub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED
Partetrub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED
Tetraptub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED
Tetrathtub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED
Coltub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED
Stencoetub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED
Condymagtub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED
Loxodestrtub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED
Zosterograptub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED
Entoditub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED
Epiditub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED
Spatitub	DKTIGGGDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKED

Pmetub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS
Euoctotub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS
Euaeditub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS
Euvantub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS
Styleltub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS
Style2tub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS
Oxytritub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS
Hcavtub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS
Halgratub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS
Strombtub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS
Partetrub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS
Tetraptub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS
Tetrathtub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS
Coltub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS
Stencoetub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS
Condymagtub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS
Loxodestrtub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS
Zosterograptub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS
Entoditub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS
Epiditub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS
Spatitub	AANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVFN SVGGGTGSGLSGLLLERLS

Pmetub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL
Euoctotub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL
Euaeditub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL
Euvantub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL
Styleltub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL
Style2tub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL
Oxytritub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL
Hcavtub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL
Halgratub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL
Strombtub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL
Partetrub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL
Tetraptub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL
Tetrathtub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL
Coltub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL
Stencoetub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL
Condymagtub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL
Loxodestrtub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL
Zosterograptub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL
Entoditub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL
Epiditub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL
Spatitub	VDYGKSKLGFYIPSPQVSTAVVEPYN SVLSTHSLEHTDVAVMLDNEAYDICRNL

Pmetub	IERTPTNLRNLIQVISSLTASLRFDGALNVDVTEFQTNLPYPRIHFMSSYAPISA
Euoctotub	IERTPTNLRNLIQVISSLTASLRFDGALNVDVTEFQTNLPYPRIHFMSSYAPISA
Euaeditub	IERTPTNLRNLIQVISSLTASLRFDGALNVDVTEFQTNLPYPRIHFMSSYAPISA
Euvantub	IERTPTNLRNLIQVISSLTASLRFDGALNVDVTEFQTNLPYPRIHFMSSYAPISA



Styleltub	IERTPTYNLNRLLIAQVISSLTASLRFDGALNVDVTEFQTNLVPYP	YIRIS	TEA	
Style2tub	IERTPTYNLNRLLIAQVISSLTASLRFDGALNVDVTEFQTNLVPYPRIHFMLSS	AP	ISA	
Oxytritub	IERTPTYNLNRLLIAQVISSLTASLRFDGALNVDVTEFQTNLVPYPRIHFMLSSYAP		ISA	
Hcavtub	IERTPTYNLNRLLIAQVISSLTASLRFDGALNVDVTEFQTNLVPYPRIHFMLSSYAP		ISA	
Halgratub	IERTPTYNLNRLLIAQVISSLTASLRFDGALNVDVTEFQTNLVPYPRIHFMLSSYAP		ISA	
Strombtub	IERTPTYNLNRLLIAQVISSLTASLRFDGALNVDVTEFQTNLVPYPRIHFMLSSYAP		ISA	
Partetr1tub	IERTPTYNLNRLLIAQVISSLTASLRFDGALNVD	TEFQTNLVPYPRIHFML	SYAPIISA	
Tetrapytub	IERTPTYNLNRLLIAQVISSLTASLRFDGALNVD	TEFQTNLVPYPRIHFMLSSYAPI	ISA	
Tetrathtub	IERTPTYNLNRLLIAQVISSLTASLRFDGALNVD	TEFQTNLVPYPRIHFMLSSYAPI	ISA	
Coltub	IERTPTYNLNRLLIAQVISSLTASLRFDGALNVDVTEFQTNLVPYPRIHFMLSSYAPI		ISA	
Stencoetub	IERTPTYNLNRLLIAQVISSLTASLRFDGALNVDVTEFQTNLVPYPRIHFMLSSYAPI		ISA	
Condyagtub	IERTPTYNLNR	ISQVISSLTASLRFDGALNVD	TEFQTNLVPYPRIHFML	SYAPIISA
Loxodestrub	IERTPTYNLNRLLISQVISSLTASLRFDGALNVD	TEFQTNLVPY	RIHFMLSSYAPIISA	
Zosterograptub	IERTPTYNLNRLLISQVISSLTASLRFDGALNVD	TEFQTNLVPYPRIHFMLSSYAP	ISA	
Entoditub	IERTPTYNLNRLLIAQVISSLTASLRFDGALNVD	TEFQTNLVPYPRIHFMLSSY	PIISA	
Epiditub	IERTPTYNLNRLLIAQVISSLTASLRFDGALNVD	TEFQTNLVPYPRIHFMLSSYAPI	ISA	
Spatitub	IERTPTYNLNRLLIAQVISSLTASLRFDGALNVD	TEFQTNLVPYPRIHFMLSSYAPI	ISA	

Pmetub	EKAYHEQLSVAEITNS	FEPASMM	KAV	DPRHGKYMACC	MYRGDVVPKDVNA	AAVATIKTK
Euoctotub	EKAYHEQLSVAEITNS	FEPASMM	AKCD	DPRHGKYMACC	MMYRGDVVPKDVNA	AAVATIKTK
Euaeditub	EKAYHEQLSVAEITNS	FEPASMM	AKCD	DPRHGKYMACC	MMYRGDVVPKDV	AAVATIKTK
Euvantub	EKAYHEQLSVAEITNS	AFEP	MAKCD	DPRHGKYMACC	MYRGDVVPKDVNA	AAVATIKTK
Styleltub	EKAYHEQLSVAEITNS	AFEPASMM	AKCD	DPRHGKYMACC	MYRGDVVPKDVNA	AAVATIKTK
Style2tub	EKAYHEQLSVAEITNS	AFEPASMM	AKCD	DPRHGKYMACC	MYRGDVVPKDVNA	AAVATIKTK
Oxytritub	EKAYHEQLSVAEITNS	AFEPASMM	AKCD	DPRHGKYMACC	MYRGDVVPKDVNA	AAVATIKTK
Hcavtub	EKAYHEQLSVAEITNS	AFEPASMM	AK	DPRHGKYMACC	MYRGDVVPKDVNA	AAVATIKTK
Halgratub	EKAYHEQLSVAEITNS	AFEPASMM	AKCD	DPRHGKYMACC	MYRGDVVPKDVNA	AAVATIKTK
Strombtub	EKAYHEQLSVAEITNS	FEPASMM	AKCD	DPRHGKYMACC	MYRGDVVPKDVNA	AAVATIKTK
Partetr1tub	EKAYHEQLSVAEITNS	AFEP	MAKCD	DPRHGKYMACC	MYRGDVVPKDVNA	AAVATIKTK
Tetrapytub	EKAYHEQLSVAEITNS	AFEP	MAKCD	DPRHGKYMACC	MMYRGDVVPKDVNA	AAVATIKTK
Tetrathtub	EKAYHEQLSVAEITNS	AFEP	MAKCD	DPRHGKYMACC	MMYRGDVVPKDVNA	AAVATIKTK
Coltub	EKAYHEQLSVAEITNS	AFEPASMM	AKCD	DPRHGKYMACC	MMYRGDVVPKDVNA	AAVATIKTK
Stencoetub	EKAYHEQLSVAEITNS	AFEPASMM	AKCD	DPRHGKYMACC	MMYRGDVVPKDVNA	AAVATIKTK
Condyagtub	EKAYHEQLSVAEITNS	FEPASMM	AKCD	DPRHGKYMACC	MMYRGDVVPKDVNA	AAVATIKTK
Loxodestrub	EKAYHEQLSVAEITNS	FEPAS	MAKCD	DPRHGKYMACC	MMYRGDVVPKDVNA	AAVATIKTK
Zosterograptub	EKAYHEQLSVAEITNS	FEPASMM	AKCD	DPRHGKYMACC	MYRGDVVPKDVNA	AAVATIKTK
Entoditub	EKAYHEQLSVAEITNS	AFEPASMM	AKCD	DPRHGKYMACC	MMYRGDVVPKDVNA	AAVATIKTK
Epiditub	EKAYHEQLSVAEITNS	AFEPASMM	AKCD	DPRHGKYMACC	MMYRGDVVPKDVNA	AAVATIKTK
Spatitub	EKAYHEQLSVAEITNS	FEPASMM	AKCD	DPRHGKYMACC	MMYRGDVVPKDVNA	AAVATIKTK

Pmetub	RTIQFVDWCPTGFKCGINYPPTVVP		
Euoctotub	RTIQFVDW	PTGFKCGINYPPTVVP	
Euaeditub	RTIQFVDW	PTGFKCGINYPPTVVP	
Euvantub	RTIQFVDWCPTGFK	GINYPPTVVP	
Styleltub	RTIQFVDWCPTGFKCGINYPPTVVP		
Style2tub	RTIQFVDWCPTGFKCGINYPPTVVP		
Oxytritub	RTIQFVDWCPTGFKCGINYPPTVVP		
Hcavtub	RTIQFVDWCPTGFKCGINYPPTVVP		
Halgratub	RTIQFVDWCPTGFKCGINYPPTVVP		
Strombtub	RTIQFVDWCPTGFKCGINYPPTVVP		
Partetr1tub	RTIQFVDWCPTGFK	GINYPPTVVP	
Tetrapytub	RTIQFVDWCPTGFK	GINYP	PTVVP
Tetrathtub	RTIQFVDWCPTGFK	GINYPPTVVP	
Coltub	RTIQFVDWCPTGFK	GINYP	PTVVP
Stencoetub	RTIQFVDWCPTGFKCGINYPPTVVP		
Condyagtub	RTIQFVDWCPTGFKCGINYPPTVVP		
Loxodestrub	RTIQFVDWCPTGFKCGINYPPTVVP		
Zosterograptub	RTIQFV	WCPTGFKCGINYP	PTVVP
Entoditub	RTIQFVDWCPTGFKCGINYPPTVVP		
Epiditub	RTIQFVDWCPTGFKCGINYP	PTVVP	
Spatitub	RTIQF	WCPTGFKCGINYPPTVVP	

Nota: las dos secuencias de *Stylonychia*, así como las correspondientes a *Paramecium*, están representadas como una única.



A partir de estos datos, se puede observar, por un lado, que el fragmento génico de la  $\alpha$ -tubulina de *Phacodinium metchnikoffi* muestra un elevado grado de similitud con las secuencias de otros ciliados, siendo éste mayor que la de otros hipotricos no euplotidos; y, por otro lado, que, como era de esperar, el grado de homología es menor en la secuencia nucleotídica que en la correspondiente de los aminoácidos.

Ciliado	a	b
<b>Subclase Stichotrichia</b>		
<i>Stylonychia lemnae</i> 1	94,3	96,2
<i>Stylonychia lemnae</i> 2	85,4	92,2
<i>Oxytrichia granulifera</i>	87,2	97,0
<i>Histriculus cavicola</i>	88,5	95,6
<b>Subclase Hypotrichia</b>		
<i>Diophrys</i> sp.	95,8	97,6
<i>Euplotes octocarinatus</i>	96,7	97,6
<i>Euplotes vannus</i>	95,4	97,5
<i>Euplotes aediculatus</i>	95,4	97,0
<b>Subclase Oligotrichia</b>		
<i>Halteria grandinella</i>	97,2	98,8
<b>Subclase Phacodiniidia</b>		
<i>Phacodinium metchnikoffi</i>		
<b>Clase Oligohymenophorea</b>		
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	96,0	96,9
<i>Tetrahymena thermophila</i>	96,3	95,2
<i>Frontonia</i> sp.	95,4	96,6
<b>Clase Heterotrichea</b>		
<i>Stentor coeruleus</i>	95,2	96,3
<i>Condylostoma magnum</i>	95,7	96,2
<i>Blepharisma</i> sp.	94,6	96,1
<b>Clase Karyorelictea</b>		
<i>Loxodes striatus</i>	95,7	97,3
<b>Clase Nassophorea</b>		
<i>Zosterograptus</i> sp.	93,9	96,3
<b>Clase Litostomatea</b>		
<i>Epidinium</i> sp.	94,2	96,3
<i>Entodinium</i> sp.	95,4	97,2
<i>Spathidium</i> sp.	95,1	97,0

**Tabla VII.** Homología de nucleótidos (a) y de aminoácidos (b), en tanto por ciento de identidad, entre el fragmento secuenciado de la  $\alpha$ -tubulina de *Phacodinium metchnikoffi* y la  $\alpha$ -tubulina otros ciliados.

El mayor porcentaje de homología en la secuencia de nucleótidos se produce en el caso del oligotrico *Halteria* (97,2%) seguido del grupo de los hipotricos (96,7-95,4%).

Como era de esperar, la homología en la secuencia de los aminoácidos es mucho más alta, pero el rango de diferencias es tan pequeño que no permite extraer conclusiones significativas.

En cuanto a la posición de determinados aminoácidos (posiciones “clave”) que podrían utilizarse como marcas taxonómicas de grupo y, por tanto, tener un valor taxonómico, destacan estas:



- En los esticotricos, aparece glutamina (Q) en la posición 128 y leucina (L) en la posición 317, aminoácido este último que también aparece en *Phacodinium*; sin embargo, ambas posiciones coinciden en el caso del nasoforo *Zosterograptus*.

- En los heterotricos, kariorelictidos y litostomos, en la posición 215 hay un residuo de glutamina (Q), en vez de asparagina (N).

Si únicamente comparamos las posiciones distintivas de aminoácidos de *Phacodinium metchnikoffi* con las de otros ciliados, deducimos algunas conclusiones interesantes:

-Comparte con los euplotidos un residuo de alanina (A) en la posición 65.

-En la posición 128, se presenta un residuo de glutamina (Q) como ocurre en los espirotricos, mientras que en el resto de ciliados aparece asparagina (N).

-En las posiciones 136 y 137, encontramos residuos de leucina y valina (L, V), compartidos por todas las especies de ciliados, con excepción de *Euplotes aediculatus* y *Euplotes octocarinatus*.

-En la posición 275 aparece, al igual que en espirotricos y en euplotidos, valina (V).

-En la posición 295, hay serina (S), al igual que en *Euplotes aediculatus* y *Euplotes octocarinatus*.

-En la posición 317, se observa un residuo de leucina (L), carácter compartido con los espirotricos. El resto presenta, en la misma posición, metionina.

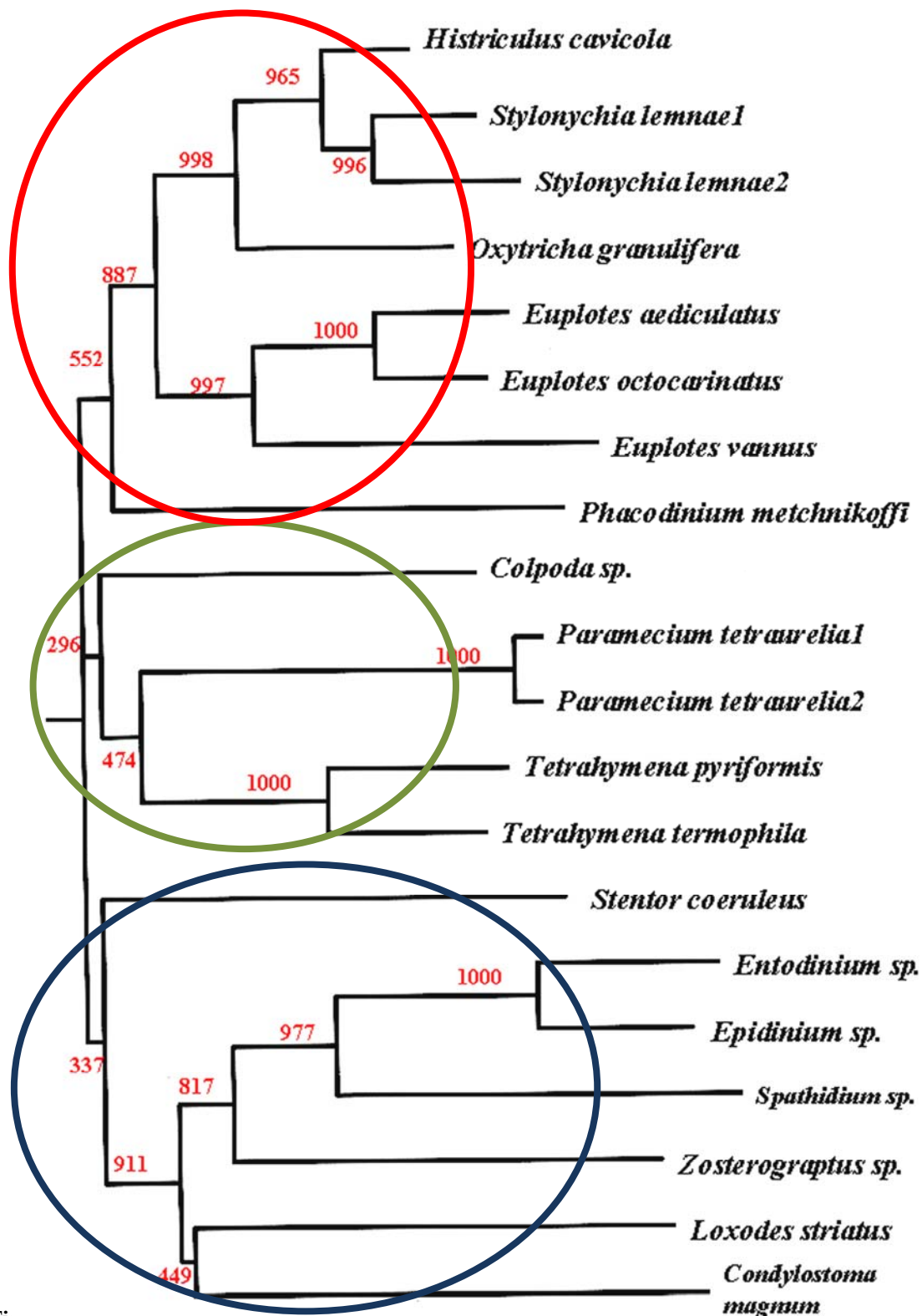
Sin embargo, las marcas de aminoácidos en una determinada secuencia no son concluyentes sobre la pertenencia a un taxón determinado, ya que aparecen numerosas excepciones sobre la taxonomía conocida, lo cual indica que el análisis de parsimonia es imprescindible para obtener el árbol filogenético.

#### 4.5.4. Árbol filogenético para la $\alpha$ -tubulina

Como ya han establecido otros autores (Baroin *et al.*, 1998), la  $\alpha$ -tubulina es un buen marcador para inferir, dentro del filo de los ciliados, relaciones filogenéticas en niveles taxonómicos inferiores.

Se utilizó como grupo externo el de los apicomplejos (Apicomplexa), ya que, con diferentes marcadores, han aparecido siempre asociados a los ciliados, con los que forman el grupo de los Alveolata (Baldauf *et al.*, 2000).

En la siguiente figura, se muestra el árbol filogenético elaborado mediante el análisis “Neighbor-Joining”, en el que aparecen exclusivamente los grupos pertenecientes a los ciliados:



Fig

secuencia de los nucleótidos de  $\alpha$ -tubulina de las especies señaladas. La escala representa 1.000 reemplazamientos por posición. El patrón general de este árbol es una multifurcación que representa diferentes grupos, algunos de los cuales no están sólidamente establecidos, por lo que se eliminan los valores inferiores al 50%.



El patrón general del árbol es una multifunción que muestra tres grandes clados:

-El primero corresponde a los espirotricos, si bien no constituye un grupo sólido. Se distribuye en tres subgrupos con valores robustos de atrapamiento: euhipotricos, euplotidos (pseudohipotricos) y una rama independiente de aquellas con la especie *P. metchnikoffi*, cuya emergencia es mucho más temprana que la del resto de espirotricos.

-Un segundo grupo incluye los oligohimenóforos y colpódidos.

-Un tercer clado agrupa heterotricos y kariorelictidos.



## **V. DISCUSIÓN**

---



En este capítulo se comparan los resultados obtenidos en la presente tesis para *Phacodinium metchnikoffi* con aquellos otros de la bibliografía para especies situadas próximas filogenéticamente. Dicha comparación se ha llevado a cabo siguiendo el orden expositivo de la tesis en su capítulo IV, con sus respectivos apartados.

En cualquier caso, hay que precisar que, tomando como referencia los últimos estudios filogenéticos más completos al respecto, Miao *et al.* (2007) y Li *et al.* (2009), así como los realizados por nosotros (Calvo *et al.*, 1992; 1995), se han considerado, por su posición basal y proximidad a la de *Phacodinium metchnikoffi*, los siguientes grupos:

- El de los heterotricos.
- El de los espirotricos más basales, grupo representado por los protocruzidos (considerados clásicamente kariorelictidos).
- El del género *Licnophora* (considerado clásicamente como heterotrico).
- El que se sitúa en la base de los hipotricos, representado por *Phacodinium* (considerado clásicamente como heterotrico) y por *Kiitricha*.
- El que agrupa a los hipotricos no euplotidos como *Uronychia*, *Diophrys*, *Gastrocirrhys*, *Euplotidium* y *Aspidisca*.
- El de los hipotricos euplotidos.

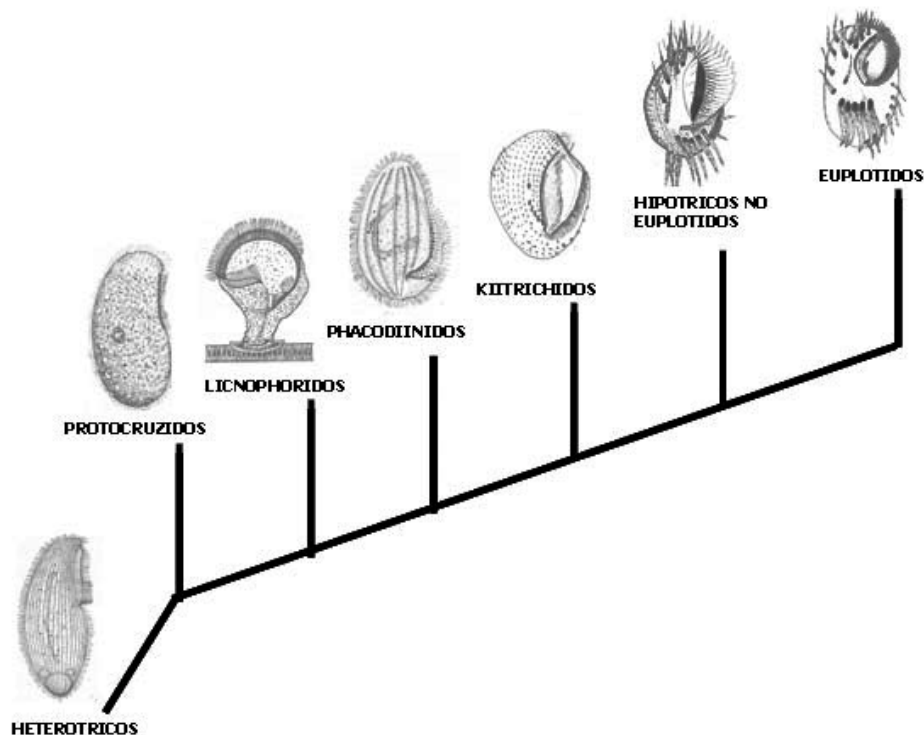


Fig. 160. Grupos con posición basal en la Clase Spirotrichea



## 5.1. ULTRAESTRUCTURA Y FILOGENIA

### 5.1.1. Superficie celular o córtex

Didier y Dragesco (1979), al igual que da Silva (1993), señalan en *Phacodinium* la presencia de un posible epiplasma que subyace a la capa alveolar. Nuestros resultados de inmunofluorescencia con el anticuerpo Epi33 no muestran tinción específica. No obstante, este anticuerpo está dirigido frente a proteínas asociadas a la periferia del epiplasma de *Paramecium* (Jeanmaire-Wolf *et al.*, 1993), que podrían ser específicas de este ciliado y no estar asociadas al epiplasma de *Phacodinium*. En las fotografías al microscopio electrónico sí aparece una fina capa de epiplasma, especialmente en la zona cortical del área oral.

El epiplasma parece ser poco frecuente entre los heterotricos, si bien se ha descrito en algunas especies como *Spirostomum sp.*, *Climacostomum sp.*, *Blepharisma japonicum* y *Plagiotoma sp.* (Peck *et al.*, 1975).

En *Protocruzia* (Hill, 1990), la célula está rodeada por la membrana plasmática, por debajo de la cual se sitúa una capa alveolar discontinua, pero no se ha descrito un epiplasma diferenciado ni ningún límite ecto-endoplasmático de naturaleza fibrilar. Esta estructura cortical coincide con la descrita en *Licnophora* (da Silva Neto, 1994).

En *Kiitricha* (Fleury *et al.*, 1986) se han descrito numerosos orgánulos asimilables a mucocistos, si bien no se conoce con detalle cuál es la ultraestructura cortical.

En hipotricos no euplotidos, el epiplasma no es un elemento común del córtex: en *Uronychia* (Hill, 1990; Song *et al.*, 2004), el epiplasma recubre una capa alveolar discontinua, con pequeños alveolos regularmente espaciados, mientras que, en *Euplotidium* (Giambelluca *et al.*, 1995), el córtex está formado por la membrana plasmática y el sistema alveolar (asociado a microtúbulos subpeliculares longitudinales y transversos), pero no se distingue ningún epiplasma.

En los euplotidos, existe un material fibroso, que algunos autores consideran un epiplasma (Tuffrau *et al.*, 1968), mientras que para otros es de naturaleza alveolar. Este es un material denso a los electrones que permanece después de la permeabilización con detergentes, similar al epiplasma de otros ciliados, pero que algunos autores no consideran como tal por situarse en el interior de los sacos alveolares (Ruffolo, 1976). Arregui (1998) demostró, en el caso de *Euplotes focardii*, que esta capa podría contener tubulina no polimerizada.

Por tanto, aunque Fleury (1995) considera que la estrategia epiplasmática es uno de los caracteres corticales que deben ser tenidos en cuenta para diferenciar los grandes grupos de ciliados, no parece que esta estrategia sea determinante en las primeras etapas de su evolución, por lo que en las líneas menos evolucionadas podrían haber coexistido varios elementos citoesqueléticos, como señala la misma autora.



### 5.1.2. Elementos citoesqueléticos microtubulares

A diferencia de los organismos superiores, en los que se han descrito varios genes que codifican para  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina (Raff, 1984, Sullivan, 1988), en los ciliados la variabilidad de los sistemas microtubulares está determinada fundamentalmente por las modificaciones postransduccionales (poliglicilación, acetilación, tirosilación, glutamilación y fosforilación) (Denoulet *et al.*, 1988). La utilización de una amplia batería de anticuerpos dirigidos contra tubulina (TEU 435), así como de tubulina glutamilada (GT335), glicilada (mono- TAP 952 y poliglicilada AXO 49) o acetilada (TAP 952 y TEU 348), ha permitido la caracterización del citoesqueleto microtubular de *Phacodinium metchnikoffi*. En general, los sistemas microtubulares de este ciliado coinciden con los de otros ciliados y organismos pluricelulares en la existencia de distintas poblaciones de microtúbulos (Adoutte *et al.*, 1985, 1991; Arregui, 1999, Arregui *et al.*, 1994), que presentan acetilación (Fleury, 1991; Adoutte *et al.*, 1991; Delgado-Viscogliosi *et al.*, 1996; Arregui, 1998), poliglutamilación (Bré *et al.*, 1994) y poliglicilación (Levilliers *et al.*, 1995; Redeker *et al.*, 1994; Xia *et al.*, 2000).

Al igual que ocurre en *Paramecium*, en *Phacodinium metchnikoffi* se pueden distinguir varios sistemas microtubulares en la célula interfásica que están, en parte, relacionados con las propiedades de estabilidad o de unión a membrana (Adoutte *et al.*, 1991; Fleury *et al.*, 1994). Los sistemas corticales y citoplásmicos de naturaleza microtubular se han estudiado en los ciliados *Euplotes sp.*, *Paramecium sp.*, *Paraurostyla* y *Tetrahymena* (Fleury *et al.*, 1994; Delgado *et al.*, 1988; Arregui, 1999).

La acetilación de la tubulina es una modificación postransduccional que se produce en microtúbulos polimerizados y que incrementa su estabilidad (Bré *et al.*, 1987; Cohen y Beisson, 1988; Bulinsky y Gundersen, 1991). Según Adoutte *et al.* (1991), la acetilación podría ser una modificación postransduccional que tiene lugar una vez se ha producido el ensamblaje en el lumen de los microtúbulos, tanto axonemales como corticales. En *Paramecium sp.*, los microtúbulos acetilados parece que se encuentran en sistemas ligados a membrana, como son el sistema vacuolar, los cinetosomas y sistemas fibrilares asociados, y las redes periféricas o intracitoplásmicas (microtúbulos que se originan desde la región oral), lo cual está en concordancia con nuestros resultados. La acetilación en las redes corticales de *Phacodinium metchnikoffi* se restringe a una subpoblación de haces microtubulares derivados de las fibras postciliares de la infraciliación somática. En *Paramecium sp.*, la acetilación está también restringida, en la red periférica, a un área definida (Fleury *et al.*, 1994).

La glutamilación se ha descrito como una de las modificaciones postransduccionales más ampliamente distribuida entre los ciliados, lo cual ha llevado a Bré *et al.* (1994) a sugerir que este tipo de modificación podría haber aparecido de forma temprana en la evolución. Tanto en *Paramecium sp.* como en *Paraurostyla weissei* y *Euplotes eurytostomus*, la glutamilación se detecta en los cilios somáticos y orales. En el ciliado oligohimenóforo, están glutamiladas tanto la tubulina componente de microtúbulos axonemales, como la tubulina de sistemas corticales estables asociados a la membrana y los sistemas citoplásmicos, por lo que se piensa que la glutamilación podría estar presente tanto en microtúbulos estables como lábiles (Bré *et al.*, 1994). Se ha propuesto que la poliglutamilación podría estar implicada en la interacción tubulina-



dineína y la motilidad flagelar (Gagnon *et al.*, 1996). En *Euplotes*, además de los microtúbulos axonemales, se encuentran glutamilados haces corticales y microtúbulos perimacro y micronucleares (Olins *et al.*, 1989). En *P. metchnikoffi*, la glutamilación parece ser una modificación común tanto a microtúbulos estables (cilios, cinetosomas y red longitudinal cortical) como a dinámicos (red intracitoplásmica), lo cual estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en otros ciliados. Sin embargo, en *Phacodinium* no se encuentran glutamilados los microtúbulos asociados a la periferia de macro- y micronúcleo como en los euplótidos, aunque éstos sí están acetilados.

Los anticuerpos dirigidos frente a epítomos de tubulina axonemal y contra tubulina axonemal monoglicilada (CTR210 y TAP952) se encuentran tanto en sistemas microtubulares estables como dinámicos. Sin embargo, la poliglicilación (AXO 49) parece estar restringida a los axonemas ciliares y los cinetosomas; por tanto, sólo reconoce una subpoblación de los microtúbulos estables. La poliglicilación (AXO 49), descrita por primera vez en microtúbulos axonemales de *Paramecium* (Redeker *et al.*, 1994), se ha considerado característica de sistemas microtubulares muy estables y parece estar implicada en la polimerización de la tubulina y en la modulación de las interacciones con MAPs, así como en el anclaje de los microtúbulos axonemales en la membrana (Fleury *et al.*, 1994). La poliglicilación se ha descrito asociada fundamentalmente a los microtúbulos axonemales en los metazoos (Kann *et al.*, 1998; Million *et al.*, 1999), mientras que en *Paramecium* y *Tetrahymena* es una modificación que afecta tanto a redes microtubulares como a microtúbulos axonemales (Bré *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 2000).

Nuestros resultados están de acuerdo con los de estos autores en cuanto a la reactividad de la red cortical longitudinal con anticuerpos monoglicilados y glutamilados, así como en cuanto a la reactividad de una subpoblación de la misma red con anticuerpos dirigidos contra microtúbulos acetilados. Además, en la especie estudiada otra subpoblación de microtúbulos corticales de la red longitudinal se detecta exclusivamente con anticuerpos anti-tubulina glutamilada, como señala Arregui (1999) en *Euplotes focardii*. Por tanto, coincidimos con Iftode *et al.* (2000) en que, tanto en *Phacodinium* como en *Paramecium*, se demuestran diferentes grados de glicilación del citoesqueleto microtubular, desde poliglicilación en axonemas ciliares y cinetosomas hasta niveles intermedios de glicilación en subpoblaciones de microtúbulos corticales y citoplasmáticos.

En cuanto a la ausencia de reacción frente a los anticuerpos de tubulina tirosilada, parece ser un fenómeno general en ciliados, aunque se ha descrito en algunas especies de *Tetrahymena* (Dupuis-Williams *et al.*, 1996) y en algunas especies de *Euplotes*, como *E. eurytomus* (Olins *et al.*, 1989).

Estudios inmunocitoquímicos semejantes a todos los que estamos reseñando sólo existen, dentro de los espirotricos, en *Paraurostyla* y *Euplotes*. La conclusión es que la mayoría de los antígenos microtubulares se ha conservado en gran medida en la evolución por lo que tienen estructuras similares en especies filogenéticamente muy separadas. Su utilidad filogenética es la de definir grandes taxones.

Al tratar de hacer congruentes los árboles filogenéticos y los datos sobre el patrón citoesquelético microtubular, no podemos sino estar de acuerdo con Fleury *et al.*



(1995) en que, en ciertas líneas basales dentro de los grandes grupos de ciliados, la estrategia de diferenciación cortical podría no estar claramente definida. Por ejemplo, dentro de los heterotricos, con una estrategia cortical basada en el desarrollo de haces de microtúbulos que proceden de la infraciliación somática, los géneros más basales, caso de *Metopus* o *Brachonella*, poseen caracteres “intermedios” como la presencia de fibras cinetodésmicas o epiplasma. En nuestro caso, *Phacodinium* sería un ejemplo característico de una línea situada en la base evolutiva de los espirotricos, donde se conservan todavía características comunes a varios grupos: en el córtex, coexisten haces microtubulares que proceden de microtúbulos postciliares junto con otros independientes de la infraciliación (estrategia de los hipotricos y esticotricos), y además aparecen fibras cinetodésmicas y epiplasma. Representarían un tipo de ciliados que todavía conserva muchas “potencialidades” de organización cortical. Parece que los grupos basales de espirotricos (protocruzidos, licnofóridos, kiitrichidos y phacodiinidos, más el grupo de hipotricos no euplóticos) comparten esta organización del citoesqueleto. Los estudios ultraestructurales de estos grupos son muy escasos, aunque sabemos que en algunos de ellos, como *Kiitricha* y *Uronychia* (Fleury *et al.*, 1985), la organización de microtúbulos antes descrita se solapa con la que predomina en la mayoría de los heterotricos.

Además en *Phacodinium* (Calvo *et al.*, 1995), como ocurre en *Kiitricha* y *Uronychia*, existe una red microfibrilar de nudos de condensación en la zona profunda. Según Fleury *et al.* (1985), este carácter ya era indicativo del alejamiento de estos géneros de los heterotricos, que no poseen este sistema, mientras que, por el contrario, suponía su cercanía a los espirotricos, como *Uronychia*, que sí lo presenta.

Muy al contrario, el córtex en *Aspidisca*, *Diophrys* o *Euplotes* se caracteriza por una estrategia muy diferente: existe un epiplasma inmediatamente por debajo de la membrana plasmática, bajo el que se sitúa una red longitudinal cortical y, por debajo de ésta, una red transversal, ambas microtubulares pero con una distribución dorso-ventral diferenciada.

En resumen, parece que las especies de espirotricos que tienen microtúbulos postciliares en asociación con otros elementos citoesqueléticos, representan líneas primitivas, caso éste de *Kiitricha*, *Uronychia* o *Phacodinium*, que son especies basales a los espirotricos.

### 5.1.3. Infraciliación somática

Con respecto a las policinéticas, en el caso de *Phacodinium*, además de la presencia de una fibra cinetodésmica estriada, dirigida perpendicularmente, y del desarrollo de haces microtubulares postciliares, se presentan una fibra transversa microtubular (T1) localizada en el cinetosoma anterior de cada segmento y fibras transversas de escaso desarrollo, formadas únicamente por 2 microtúbulos. Además, existe un microtúbulo adicional cerca del triplete 5. Este patrón infraciliar se corresponde con el descrito en los heterotricos (Iftode *et al.*, 1982), pero en ellos hay dicinéticas con una polaridad marcada en sus derivados fibrilares y fibras cinetodésmicas no estriadas (Lynn, 1981, 1991). Las policinéticas no parecen estar formadas por dicinéticas, puesto que todos los cinetosomas tienen los mismos derivados fibrilares, por lo que el patrón infraciliar no se corresponde con el de los heterotricos, ya



que en éstos únicamente el cinetosoma anterior es el que presenta microtúbulos transversos, mientras que el posterior tiene fibra cinetodésmica y microtúbulos postciliares. Una estructura somática semejante a la de *Phacodinium* se encuentra en *Transitella* (Iftode *et al.*, 1983), que tiene polidicinétidas. Ambas estructuras serían pseudocirros, ya que cada cinetosoma conserva todos sus derivados fibrilares.

En esta última especie, los segmentos de cinetosomas alineados en dos filas paralelas, encontramos que, en la parte inicial de los segmentos cinéticos, todos los cinetosomas son idénticos, con un haz postciliar desarrollado y una fibra cinetodésmica. Parece imposible pensar que se trate de típicas dicinétidas, como es característico de los heterotricos, ya que en éstos el cinetosoma anterior es el que sólo tiene microtúbulos transversos y el posterior tiene o fibra cinetodésmica o banda de microtúbulos postciliares. Por tanto, la unidad de la policinétida recuerda la de un cirro, pero sin tener su ultraestructura. El lado dorsal de *Transitella* presenta dicinétidas en las que sólo el cinetosoma anterior es ciliado.

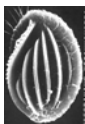
En *Protocruzia* (Grolière *et al.*, 1980), aparecen dicinétidas con cinetosomas ciliados. En ellas, ambos cinetosomas tienen fibras transversas, si bien las del cinetosoma posterior están formadas por un número menor de microtúbulos y la fibra cinetodésmica y postciliar se asocian únicamente a este cinetosoma. Lynn (1991), al realizar un estudio comparativo de este ciliado, hasta entonces kariorelictido, con otros, como *Geleia* y *Remanella*, destacó la gran variabilidad dentro del grupo. Los estudios moleculares corroboraron la inclusión de las especies con fibras postciliares entre los espiotricos, según la clasificación de Corliss (1979), dentro de los cuales se situaban heterotricos e hipotricos.

En los licnoforidos, las cinétidas están formadas por dicinétidas. Estas dicinétidas somáticas presentan fibras transversas asociadas al cinetosoma anterior y fibras no estriadas y fibras pre- y postciliares asociadas al cinetosoma posterior. La cinetia más externa del disco adhesivo origina en la parte anterior de cada dicinétida un haz de fibras transversas, un microtúbulo suplementario y un espolón denso a los electrones.

Es llamativa la presencia en *Licnophora* (da Silva Neto, 1994) de microtúbulos prepostciliares de los cinetosomas posteriores, que también aparecen en *Phacodinium*, aunque en este caso la ciliación no está constituida por dicinétidas. Por otro lado, en aquella especie se presentan fibras cinetodésmicas estriadas y no estriadas, aunque en cinetias diferentes, mientras que en *Phacodinium* todos los cinetosomas presentan fibra cinetodésmica estriada. La existencia de sectores de la ciliación somática próxima a la boca de tipo particular pseudocírrico aparece en este ciliado al igual que en *Phacodinium*.

En el caso de *Kiitricha* (Fleury *et al.*, 1985), la ciliación somática es diferente dorso-ventralmente. Ventralmente, los cinetosomas de los cirros se unen entre sí por uniones transversales dobles y oblicuas simples. Los cinetosomas de la fila derecha portan cada uno fibras postciliares, mientras que los de la zona dorsal, que son sólo cirros formados por dobles hileras, portan fibras cinetodésmicas. Existen, además, uniones intercinetosómicas densas en los cirros, propias de los hipotricos. Por ello, Fleury *et al.* (1986) se aventuró a la inclusión de *Kiitricha* en los hipotricos. En un





trabajo reciente, Kuidong *et al.* (2008) proponen que *Kiitricha* posiblemente represente un estado entre los hipotricos con cirros ventrales y dicinétidas dorsales, cada una con un único cilio, y las subclases Protocruziidia, con sólo dicinétidas somáticas, cada una con uno o dos cilios, y Phacodiniidia, con cinetias somáticas formadas por policinétidas lineales.

En los denominados hipotricos no euplotidos, como *Uronychia* (Fleury *et al.*, 1985), los cirros están formados por numerosos cinetosomas ciliados ligados por uniones sencillas y dobles. En la periferia del cirro se observa, a media altura, un discreto material denso, mientras que en profundidad existe una red microfibrilar nodular, que se origina de los cinetosomas más externos del cirro. Ciertos cinetosomas tienen derivados postciliares y otros, derivados transversos, pero en el lado ventral no hay fibra cinetodésmica. Sin embargo, en el lado dorsal nos encontramos, como en *Kiitricha*, con cinetosomas dobles en los que sólo el anterior, ciliado, tiene derivados transversos, y el posterior, fibras postciliares así como fibra cinetodésmica. *Uronychia* es el que, en consecuencia, parece estar situado en la base de este grupo de organismos.

En otros hipotricos no euplotidos como *Diophrys* (Fleury *et al.*, 1986), *Certesia* (Wicklow, 1983) y *Euplotidium* (Lei *et al.*, 2002), la organización del cirro es parecida a la de otros euplotidos clásicos (*Euplotes* y *Aspidisca*): en ellos, los cirros frontoventrales se distribuyen siguiendo un patrón determinado y no existen cirros marginales izquierdos ni caudales. Los cinetosomas de cada cirro ventral se unen entre sí por dos tipos de microfibrillas, uniones proximales (simples y dobles) y distales (simples). Como en los euplotidos, los microtúbulos postciliares y la fibra cinetodésmica se asocian con los cinetosomas del lado derecho de cada cirro, pero en la base de los cirros no se observa material denso. Cada cerda dorsal consiste en un par de cinetosomas conectados entre sí por material denso que carecen de fibra cinetodésmica. Estructuralmente, estos géneros parecen estar relacionados de forma más directa con los euplotidos.

El patrón de infraciliación somática dorsal y ventral es, por tanto, bastante homogéneo en los euplotidos clásicos y en los denominados hipotricos no euplotidos y este carácter -la disposición de los derivados fibrilares y su diferenciación dorso-ventral- sí parece adecuado para establecer grupos monofiléticos. Sin embargo, la heterogeneidad que muestra el resto de grupos basales de los espiotricos puede deberse, como en el caso del córtex, a una potencialidad todavía no desarrollada, por lo que se trataría de un grupo parafilético.

#### 5.1.4. Infraciliación oral

Hay que reseñar que, en opinión de numerosos autores, la infraciliación bucal no es un buen marcador filogenético, dado que, por la necesidad de adaptación al hábitat para conseguir el alimento, es el primer orgánulo en transformarse y, en consecuencia, puede sufrir una convergencia evolutiva. Otros autores (Grain, 1995; Eisler, 1992, 1995) mantienen, sin embargo, su importancia evolutiva, no tanto por su morfología como por su ontogénesis durante el proceso estomatogénico (véase el capítulo I “Introducción”).



En *Phacodinium*, se observan fibras postciliares asociadas tanto al complejo paroral como a las membranelas. La presencia de fibras postciliares y transversas en las paramembranelas es propia de hipotricos. Numerosos nemadesmos y redes microfibrilares se asocian con los orgánulos bucales, cuya yuxtaposición es difícil de encontrar tanto en heterotricos como en hipotricos. Sí que aparece en otra especie muscícola, *Transitella*, clasificada tradicionalmente entre los heterotricos y después como un orden dentro de los hipotricos.

*Transitella*, con un desarrollo semejante a *Phacodinium* de la zona oral, tiene una paroral de tipo diploesticomonada a la que se asocian una red microfibrilar nodular y de nemadesmos. En *Phacodinium* el complejo paroral es una poliesticomonada con sólo una fila de cinetosomas ciliados y también se presenta la red nodular.

En *Protocruzia*, las 6 membranelas están, en su mayoría, constituidas por 4 filas de cinetosomas. De ellas, la fila más a la derecha tiene fibras postciliares rodeadas de material denso, y la situada más a la izquierda, microtúbulos transversos. Los cinetosomas se conectan por desmosomas, y las membranelas, por una red microfibrilar. La paroral está formada por dos filas de cinetosomas ciliados de los que los de la fila interior portan microtúbulos postciliares.

En los licnoforidos, las paramembranelas, con tres filas de cinetosomas, tienen fibras postciliares en todos los cinetosomas y fibras pre- y postciliares en los cinetosomas de la fila derecha de cada organelo. Presentan nemadesmos y/o una red microfibrilar que se origina en los cinetosomas. La formación paroral está formada por una sola fila de cinetosomas cada uno con fibras postciliares.

En *Kiitricha*, toda la ZAM tiene tres filas de membranelas unidas por una red microfibrilar superficial, que están asociadas en su base a una red microfibrilar nodular. La paroral tiene dos partes: una fila interna de cinetosomas y varias filas externas cuyos cinetosomas se unen por medio de microfibrillas de forma semejante a la que aparece en *Phacodinium*.

En hipotricos no euplotidos como *Uronychia* (Fleury *et al.*, 1986), el sistema bucal está particularmente bien desarrollado y la parte anterior de la ZAM está formada por paramembranelas unidas entre ellas por una red microfibrilar con nudos de condensación. La paroral aparece como una diploesticomonada, si bien muy desarrollada, ya que su longitud es 2/3 de la ZAM.

En *Diophrys*, la membrana paroral y la endoral están muy desarrolladas, lo que se considera como rasgo primitivo, razón por la que se lo ha situado siempre en la base de los hipotricos clásicos.

Por tanto, la aparente dirección en la evolución cortical en la base de los hipotricos ha sido la siguiente:

- Se da la presencia de un epiplasma más o menos desarrollado, que coexiste con otras estructuras corticales.

- Se produce una progresiva diferenciación de la infraciliación ventral y dorsal.



-Se dispone una red microtubular superficial ventral.

-Los grupos más basales presentan una arquitectura cirral variable, con diferentes patrones pre-cirrales y cirrales, que tienen en común un mayor desarrollo de las fibras postciliares.

-En el lado dorsal, se suelen presentar dicinétidas “sensu estricto” (microtúbulos transversos en el cinetosoma anterior y microtúbulos postciliares y fibra cinetodésmica en el posterior).

-Aparecen redes microfibrilares que se originan de la base de los cinetosomas y discurren próximas al cirro.

-El embudo bucal está fundamentalmente reforzado por microtúbulos en los euplótidos y en el resto de los espirotricos, fundamentalmente en los grupos basales, por una red microfibrilar nodular, como ocurre en *Phacodinium*, *Kiitricha* y *Uronychia*.

-La estructura paroral es variable en los grupos primitivos y evoluciona hacia un complejo paroral en los euplótidos (*Phacodinium*, *Euplotes* y *Euplotidium*) y hacia una doble membrana, paroral y endoral, en los esticotricos.

#### 5.1.5. Aparato nuclear

En contraste con los datos conocidos para otros ciliados, la génesis del macronúcleo en el taxon de los hipotricos “sensu lato” -incluyendo en ellos los grupos de los esticotricos (*Stylonychia*, *Oxytricha*, *Urostyla*, *Sterkiella*, etc) y los euplotidos (ahora hipotricos, “sensu estricto”) -comparte muchos rasgos del desarrollo macronuclear: destacan la formación y la segmentación de cromosomas politénicos, que originan un macronúcleo de tipo cromomérico, así como la formación de bandas de replicación en el macronúcleo vegetativo (Raikov, 1982). Estas bandas han sido definitivamente descritas, dentro de los espirotricos, en los esticotricos, euplotidos, coreotricos, oligotricos y licnoforidos y, en el presente trabajo, también en *Phacodinium*.

Otra característica de tipo hipotrico que se presenta en el macronúcleo de *Phacodinium* se refiere al contenido de A+T: el ADN macronuclear de hipotricos no es tan rico en A+T como en otros ciliados; por ejemplo, el ADN de *O. fallax* tiene aproximadamente un 68% de A+T (287), mientras que el de *Tetrahymena* tiene un 76% (Yao y Gall, 1979; Allen y Gibson, 1973). En cambio, *Kiitricha* (Li et al., 2009) presenta un contenido A+T del 57%, y *Phacodinium*, del 55,5 %.

Cuando la moderna taxonomía ha separado los euplótidos como una rama temprana dentro de los espirotricos, han aparecido detalles moleculares que sustentan esta segregación: los hipotricos tienen un código genético degenerado diferente al de los espirotricos y numerosos genes que utilizan “frameshifts” programados, así como secuencias de eliminación internas, la mayoría del tipo “TA” (Klobutcher y Farabough, 2002). Katz y Riley (2001) arguyen que el proceso de generación de cromosomas de tamaño génico MAC ha evolucionado independientemente en una variedad de líneas de ciliados y, por tanto, no es válido para las inferencias filogenéticas, sin embargo,



reconocen que las características compartidas respecto al macronúcleo sí que consolidan el grupo de los espirotricos.

Es importante destacar otro hecho en relación al núcleo, que ha sido sometido a diferentes interpretaciones evolutivas: la diferenciación nuclear en la mayoría de los ciliados implica una reorganización del ADN en el macronúcleo. Sin embargo, en kariorelictidos como *Loxodes*, el macronúcleo permanece diploide o paradiploide y no se divide. En otros clásicos kariorelictidos como *Protocruzia*, el macronúcleo consta de más de 10 fragmentos macronucleares, cada uno con un nucleolo, que rodean a un único micronúcleo. Ruthmann y Hauser (1974) describieron cómo en estos macronúcleos de *Protocruzia* se formaban dos bandas paralelas de cromatina, que iban separando los macronúcleos-hijos según progresaba la división y propusieron que cada macronúcleo contendría un único homólogo de cada cromosoma micronuclear, porque la oligotenia era varias veces más grande, con 6-10 veces más ADN. Si estas estructuras macronucleares fuesen cromosomas, *Protocruzia* sería el único ciliado en exhibir este carácter, por lo que se podría confirmar su situación en la base del árbol de los ciliados dentro de los kariorelictidos (Small y Lynn, 1981, 1985; de Puytorac *et al.*, 1993). En esos años, la mayoría de los autores asumían que un protista de tipo kariorelictido sería el representante más antiguo del grupo de los ciliados, ya que básicamente los núcleos paraploides, incapaces de dividirse, son más ancestrales y representan una “reliquia evolutiva” (Raikov, 1982; Corliss, 1979; Lynn y Corliss, 1991).

Posteriormente, los estudios moleculares y su consenso con los datos ultraestructurales -similitudes en el córtex somático del kariorelictido *Tracheloraphis* y el heterotrico *Blepharisma* o la ultraestructura de la dicinétida de *Protocruzia*, de tipo heterotriquido (Lynn, 1991)- conducen a agrupar a los kariorelictidos con los heterotricos. Pero ambos aparecen como grupos hermanos, es decir, los kariorelictidos no son descendientes directos del primitivo ciliado y, además, la dicotomía entre estos dos grupos y los intramacronucleata es casi simultánea. Por tanto, es más parsimonioso asumir (Hammerschmidt *et al.*, 1996) que el macronúcleo capaz de dividirse es el más ancestral y que de éste evolucionaron los ciliados con macronúcleo indivisible, previos a la radiación de los kariorelictidos. Simultáneamente, se puede plantear la hipótesis de que el macronúcleo capaz de dividirse evolucionó al menos dos veces, una, con la ayuda de los microtúbulos extramacronucleares, hacia los Postciliodesmatophorea, y otra, con los microtúbulos intramacronucleares, hacia los Intramacronucleata.



## 5.2. MORFOGÉNESIS Y FILOGENIA

De acuerdo con la clasificación de Foissner (1996) sobre los tipos de estomatogénesis, *Phacodinium metchnikoffi* tiene un tipo de división paracinética (PK) de subtipo poliparacinético (PPK), ya que son varias las cinetias somáticas parentales que participan en la formación del nuevo primordio oral. Esta división es típica de los heterotricos, pero también se ha descrito en numerosos espirotricos.

En los espirotricos se han definido tres tipos de estomatogénesis:

- Paracinética, en algunos esticotricos (oxitrichidos y urostilidos).
- Epiapocinética.
- Hipoapocinética, en los hipotricos actuales, como *Euplotes* o *Uronychia*.

En cuanto a las especies sobre las que estamos haciendo un estudio filogenético comparativo, siempre que existan datos morfofénéticos, sabemos lo siguiente:

\*En el caso de los protocruzidos, la morfogénesis es de tipo mixocinético, ya que de la membrana paroral del protero se forman las membranelas adorales del opisto y la membrana paroral del opisto se origina por proliferación de los cuerpos basales de la cinetia somática 1.

\**Transitella* (Iftode *et al.*, 1983) tiene una división de tipo paracinético, con la particularidad de la participación de la cinetia somática 1 del protero en el primordio bucal aunque Foissner (1996) apunta que puede ser de tipo telocinético.

\**Euplotidium* (Giambelluca *et al.*, 1995) tiene una división apocinética, en la que los primordios dorsales se desarrollan dentro de los parentales, por lo que los autores señalan que dicha división está más próxima a *Diophrys* que a la de los euplótidos.

\*En *Euplotes* y *Aspidisca*, la infraciliación parental no sufre ningún cambio, mientras que en muchos urostilidos se renueva completamente. En *Phacodinium* la infraciliación parental es parcialmente reconstruida (se produce la reabsorción de material denso y de las fibras cinetodésmicas), como ocurre en alguno de los hipotricos no euplotidos como *Uronychia* (Hill, 1990).

\*Los datos conocidos para la morfogénesis de la especie *Kiitricha marina* (Li *et al.*, 2009), la más próxima en los recientes estudios moleculares a *Phacodinium*, señalan como común para ambas especies la diferenciación de las dicinétidas dorsales con un patrón de tipo heterotrico. Sin embargo, el tipo de división apocinética y la presencia de cirros claramente diferenciados de tipo euplótido son, aparentemente (la descripción extensa de la morfogénesis de *Kiitricha* será publicada en breve, según los autores), más cercanos a los euplótidos que los que presenta *Phacodinium*.

Por último, los ciliados de tipo euplótido, clasificados tradicionalmente como pseudohipotricos (Fleury, 1988), comparte la siguiente serie de características morfofénéticas primitivas:



-El primordio oral del opisto (POP) se desarrolla “de novo”, posterior a la ZAM parental, continuando la estomatogénesis en un bolsillo subpelicular.

-El primordio oral del protero (AOP) aparece anterior a la AZM parental y no contribuye con ningún cinetosoma a los primordios cirrales.

-Los cirros transversos y frontales para protero y opisto se desarrollan a partir de cinco primordios cirrales, que se forman “de novo” dentro de un eje sencillo latitudinal para separarse y originar los campos primordiales del opisto y el protero, como en *Aspidisca*, *Certesia*, *Diophrys*, *Euplotes*, y *Euplotidium* (Deroux y Tuffrau, 1965; Song y Packroff, 1993; Song, 1995, 2003).

-Las filas dorsales de cinetias aparecen, a partir de las parentales, en una zona de desarrollo latitudinal.

-Los cinetosomas parentales se reabsorben y no participan en el desarrollo de las estructuras ciliares de las células hijas.

Las características recién mencionadas corresponden a un patrón de tipo hipoapocinético. En la fig. 132 se puede ver cómo estas características se alejan del patrón morfogenético de *Phacodinium* o de *Kiitricha*.

Muchos autores han intentado utilizar los estudios morfogenéticos como herramienta para construir la taxonomía evolutiva de los espirotricos (Bardele, 1989; Foissner, 1996). Fauré-Fremiet (1961) definió dos sub-órdenes dentro de los actuales espirotricos (antes hipotricos), de acuerdo con el patrón de infraciliación ventral:

-El suborden Stichotrichina, con numerosos cirros organizados en filas.

-El suborden Sporadotrichina, con escasos cirros dispuestos en el córtex.

Con sus estudios morfogenéticos, Tuffrau (1968) respaldó la clasificación anterior, y amplió la caracterización de los subordenes de la siguiente forma:

-En los primeros, la estomatogénesis ocurre a partir de una fila de cirros y, por tanto, es de tipo paracinético.

-En los segundos, ocurre próxima a un solo cirro o, más excepcionalmente, lejos de cualquier cirro parental, es de tipo apocinético.

Por otro lado, conjugando resultados ultraestructurales y morfogenéticos, Fleury (1988) formuló la hipótesis de la “unit of turn-over”, según la cual, el cambio de un conjunto de estructuras somáticas es interdependiente de las modificaciones nucleares que suceden. Esta unidad le permitía distinguir dos tipos de hipotricos:

a) Los pseudohypotrichina, en los que el recambio de la infraciliación somática sólo sucede en los casos de morfogénesis que no implican duplicación celular, como ocurre en la conjugación. Tal sería el caso de *Euplotes*, *Aspidisca*, *Uronychia*.



b) Los euhypotrichina, en los que el “turn-over” de toda la ciliación somática (ventral y dorsal) afecta a todos los procesos morfogenéticos.

La clásica hipótesis de Corliss (1973) sobre la secuencia evolutiva de la estomatogénesis establecía que el modo telocinético da lugar a los modos bucocinéticos y paracinéticos y que el paracinético da lugar al apocinético. Sin embargo, los datos moleculares más recientes, que agrupan a los kariorelictidos (paracinético) y a los heterotricos (en su mayoría paracinéticos), situándolos en la base del tronco de los ciliados, refutan la clásica hipótesis, ya que el patrón más primitivo sería el paracinético.

La presencia de tipos paracinéticos y epiapocinéticos puede acontecer incluso en el mismo género (por ejemplo, en *Oxytricha* y *Kahliella*), por lo que el tipo de división no puede utilizarse para una clasificación supragenérica (Foissner, 1996), pero los datos expuestos en la presente tesis sí corroboran que, en la base de los espiotricos, el modo estomatogénico fue el paracinético, el que originó el tipo apocinético de la mayoría de los pseudohipotricos, euhipotricos, halteridos y oligotricos.

### 5.2.1. Dinámica del citoesqueleto durante la morfogénesis

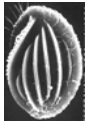
Para los estudios filogenéticos no sólo es importante considerar el patrón de cambios que se produce en la infraciliación somática y oral, sino también la dinámica de desaparición y ensamblaje de las estructuras microtubulares. La estabilidad microtubular se relaciona con la presencia de modificaciones traduccionales, de forma que, por ejemplo, la detirosilación y la acetilación están ausentes en los microtúbulos recién constituidos y, en cambio, están presentes en los más estables. Sin embargo, estas modificaciones son probablemente la consecuencia de la estabilidad de los microtúbulos más que su causa (Redeker *et al.*, 1994). Su estudio permite, por tanto, conocer cómo es la incorporación de las distintas modificaciones a los microtúbulos durante la división.

Nuestros resultados sobre *Phacodinium* coinciden con los obtenidos sobre otros protistas, como *Paramecium* (Bré *et al.*, 1994), *Trichomonas* (Delgado-Viscogliosi *et al.*, 1996) y *Euplotes* (Fleury, 1991a y b), de acuerdo con los cuales la acetilación y la glutaminación se producen poco después del ensamblaje de los microtúbulos. Sin embargo, el axonemal AXO49 se detecta largo tiempo después del ensamblaje de los microtúbulos.

Por tanto, las distintas estructuras microtubulares no tienen el mismo orden de aparición en la célula en división: los cuerpos basales y los axonemas se transmiten en un proceso totalmente conservativo (sin desensamblaje). Este hecho indica su papel de guía durante el proceso morfogenético.

No hemos detectado ninguna reacción al utilizar los anticuerpos frente a tubulina tirosilada durante el proceso de división. Esta tubulina parece servir de indicador de los microtúbulos de reciente ensamblaje, por lo que está claro que no participa en las estructuras microtubulares muy elaboradas que caracterizan a los ciliados.

En ciliados como *Paramecium*, la transmisión del patrón infraciliar durante la morfogénesis parece estar relacionada con la modificación secuencial de los



microtúbulos desde la zona ecuatorial hacia los polos (Iftode *et al.*, 1989), mientras que, en otros ciliados como los hipotricos, los mecanismos de modelización durante la morfogénesis parecen tener lugar en toda la célula, no siguiendo una dirección (Frankel, 1989).





### 5.3. CRIPTOBIOSIS Y FILOGENIA

A lo largo del enquistamiento, la célula experimenta cambios corticales y nucleares. Con respecto a los cambios en el corticotipo, la célula se redondea y la infraciliación puede o bien desaparecer o bien permanecer en la célula. En función de estos caracteres, Walker y Mangel (1976) establecieron dos grupos:

-KR (“kinetosome resorbing cysts”): ciliados con quistes en los que la ciliación cortical e infraciliación se reabsorben completamente, la pared quística está compuesta por cuatro capas, se producen fusión macronuclear así como agrupamiento mitocondrial y una gran reducción del volumen celular con respecto a la célula vegetativa.

-NKR (“non kinetosome resorbing cysts”): ciliados con quistes en los que se mantiene completa la infraciliación, la pared quística está formada por tres capas, el macronúcleo no se fusiona durante el enquistamiento, las mitocondrias se mantienen dispersas y no experimentan reducción del volumen celular durante el enquistamiento.

Estudios ultraestructurales en quistes de hipotricos (Walker y Mangel, 1980 y Walker *et al.*, 1980) mostraron tipos intermedios entre los KR y los NKR. Rios *et al.*, (1985) propusieron un tercer tipo de quistes, que Matsusaka *et al.*, (1989) denominó tipo urostilido.

En el trabajo de Martín-González *et al.*, (1991) se amplió esta clasificación para todos los quistes de ciliados con el tipo PKR (“partial kinetosome resorbing cysts”), que designa a los ciliados que experimentan una parcial reabsorción de su corticotipo y mantienen en el quiste maduro algunos elementos de infraciliación (Delgado *et al.*, 1987; Grim y Manganaro, 1985; Rios *et al.*, 1985; Walker y Hoffman, 1985).

Sin embargo, existen muchos casos, como *Euplotes rariseta*, con características especiales que no se ajustan a ninguno de los modelos concretos. Por ello, Martín-González *et al.*, (1998) propusieron distinguir dos diferentes estrategias ecofisiológicas en los euplotidos:

\*La de las especies de agua dulce (entre ellas *Euplotopsis muscicola*) que presentan:

- quistes ovales o esféricos
- pared quística compleja con dos capas
- pared con quitina
- crestas en la superficie dorsal de los quistes que no se corresponden con las del individuo vegetativo
- un proceso de enquistamiento que generalmente se induce por inanición

\*Las especies marinas, como *E. rariseta*, que presentan:

- quistes de forma oval u esférica
- crestas dorsales que no son evidentes
- una pared quística que tiene a veces una sola capa
- un enquistamiento inducido por el aumento de salinidad y cuyo proceso es más lento que en las formas de agua dulce.



Por tanto, existen claras diferencias entre distintos miembros del orden Euplotida y el resto de los hipotricos, así como entre los componentes de los esticotricos.

Como señaló Fleury (1988), se constata que la mayoría de los géneros del tipo KR pertenecen a los euhipotricos, mientras que los NKR suelen situarse en los pseudohipotricos. Desde un punto de vista morfogenético, el quiste KR presenta una inversión de la secuencia de reabsorción-síntesis observada durante la morfogénesis: durante el enquistamiento reabsorbe las estructuras infraciliares y, durante el exquistamiento, experimenta la génesis de las nuevas estructuras.

Si consideramos los resultados preliminares (Calvo *et al.*, 1992) y los aquí expuestos sobre el quiste de *Phacodinium metchnikoffi*, encontramos que sus características (pared con cuatro capas, permanencia total de los elementos ciliares y sus derivados en el estadio quístico, formación de espinas....) lo sitúan entre los quistes NKR de un pseudohipotrico, aunque con algunas particularidades frente al diagnóstico clásico de éstos. Por ejemplo, uno de los rasgos diferenciales es el tipo de vesículas del ectoquiste, de tipo fibroso a granular, y no su disposición en discos paralelos, como en otros hipotricos. El mismo tipo ha sido observado por Walker y Mangel (1980) en *Diophrys scutum*, lo que en aquel momento, se pensó que podía ser un rasgo para segregar los euplotidos de los hipotricos en sentido estricto (los esticotricos).

Para la clasificación y filogenia de los ciliados, la utilidad de los cambios corticales y citoplasmáticos durante los estados de criptobiosis ha sido, por tanto, defendida por numerosos autores (Gutiérrez y Walker, 1983; Delgado *et al.*, 1987; Martín-González *et al.*, 1991). Ese criterio ha sido utilizado en las clasificaciones como rasgo del diagnóstico de taxones (Small y Lynn, 1985). Sin embargo, los autores (Gutiérrez *et al.*, 2003) reconocen la gran variabilidad de características que presentan los quistes dentro del grupo de los espiotricos. Por tanto, creemos que el estudio quístico es un rasgo que hay que incluir en la taxonomía como diagnóstico de los grupos más que un rasgo que lleve a inducir relaciones filogenéticas, ya que las condiciones ambientales pueden influir en un rápido enquistamiento que tiene un decisivo valor de supervivencia.



## 5.4. SECUENCIACIÓN Y FILOGENIA

*Phacodinium metchnikoffi*, ciliado tradicionalmente considerado como heterotrico (Kahl, 1935; Dragesco, 1970), es en la actualidad un espiotrico próximo a los clásicos hipotricos. En la última clasificación de la Society of Protozoologists (Small y Lynn, 2000), se definen los espiotricos como ciliados con dicinetias o policinetias somáticas, con una ciliación oral compleja con numerosas paramembranelas en el lado izquierdo de la cavidad oral (ZAM) y una membrana ondulante (paroral) en el lado derecho. Los autores destacan la existencia de varias subclases de espiotricos, entre los que se encuentran sólidamente establecidos los protocruzidos, phacodiinidos, hipotricos, coreotricos, esticotricos y oligotricos, fundamentalmente debido a los resultados de estudios moleculares (Fleury *et al.*, 1995: fig. 9; Shin *et al.*, 2000: fig. 161; Bernhard *et al.*, 2001: fig. 11; Miao *et al.*, 2007: fig. 162; Li *et al.*, 2009: fig. 163).

Nuestros estudios ultraestructurales y ontogenéticos, referidos en el capítulo IV de resultados de esta tesis, confirman, sin lugar a dudas, la posición de *Phacodinium metchnikoffi* entre los espiotricos, por lo que su clásica consideración de “incertis sedis” está ya fuera de lugar. Sin embargo, hemos querido aclarar cuál es su relación filogenética con otras especies basales de los espiotricos y si los resultados moleculares son congruentes con los descritos previamente en este capítulo para las estrategias corticales e infraciliarias de dichas especies.

### 5.4.1. Comparación de los resultados filogenéticos obtenidos de las secuencias de ARNr

Las posiciones con valor filogenético significativo en las secuencias de ARNr 28S (Baroin *et al.*, 1989, 1992, 1998) fueron determinadas como 38 posiciones informativas de la secuencia de los nucleótidos con suficientes caracteres derivados compartidos para permitir la resolución de los nodos en los dendrogramas.

Los datos que obtuvimos de la secuencia de ARNr 28S de *Phacodinium metchnikoffi* (figs. 154 y 155) y su comparación con las secuencias para otros ciliados, nos permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

\* Nuestros resultados con ARNr 28S coinciden con los obtenidos por otros autores en cuanto al carácter monofilético de los ciliados (Baroin *et al.*, 1992, 1998; Shin *et al.*, 2000). Es importante señalar que, en los mencionados estudios y en otros posteriores (Hirt *et al.*, 1995; Lynn y Strüder-Kypke, 2002; Lynn, 2003), se identifica un temprano grupo emergente, constituido por heterotricos y karyorelictidos, mientras que el resto de los grupos emergen posteriormente de forma explosiva. Esto conlleva que el agrupamiento clásico de los heterotricos con los espiotricos se escinde y la posición de *Phacodinium metchnikoffi* está ahora en la base de los hipotricos.

\* Los heterotricos, claramente asociados con los karyorelictidos, constituyen un grupo monofilético. Sin embargo, los valores de atrapamiento son débiles tanto en estudios con ARNr 18S como con 28S, aunque en estos últimos los valores son algo mayores. La compleja organización de las estructuras orales que caracteriza a todos los heterotricos llevó a considerarlos como un grupo incluido entre los espiotricos (Corliss,



1979; Levine *et al.*, 1980). Todos los trabajos moleculares desde el de Greenwood *et al.*, (1991a), en el que se analizaba la secuencia completa del gen de ARNr 18S de *Blepharisma americanum*, coinciden en la emergencia temprana de este grupo, como ya se ha mencionado. En este sentido, los resultados moleculares nos hacen desechar la hipótesis tradicional de que los ciliados con aparatos orales “simples”, apicales y simétricos, son más primitivos; muy al contrario, se trata de un carácter apomórfico (divergente), y la asimetría del aparato oral es un carácter ancestral, de hecho compartido con algunos kariorelictidos.

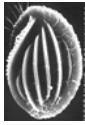
\* En relación con los heterotricos, hay que resaltar dos estudios, Hirt *et al.*, 1995 y Li *et al.*, 2009, en los que los heterotricos anaeróbicos, *Metopus sp.* y *Nyctotherus sp.* se ramifican dentro de los espirotricos, lejos de los clásicos heterotricos. Por tanto, parece que los heterotricos no forman un grupo monofilético. La explicación que hacen los autores de su semejanza morfológica es la de una convergencia evolutiva o la retención de caracteres morfológicos primitivos. Para afianzar la posición de estas especies, los autores señalan la necesidad de estudios ultraestructurales.

\* La aparición de dos grandes ramas en el grupo de los ciliados (fig. 15), Postciliodesmatophora (clases Heterotrichea y Karyorelictea) e Intramacronucleata (el resto de las clases) (Lynn, 1997, 2000), es congruente en estudios posteriores tanto de ARNr 28S como de ARNr 18S y  $\alpha$ -tubulina (Adoutte *et al.*, 1995; Baroin *et al.*, 1998; Shin *et al.*, 2000; Bernhard *et al.*, 2001). Dentro de los Intramacronucleata se segregan, según nuestros resultados, tres “clusters”, que representan grupos monofiléticos: oligohymenoforos, litostomos y espirotricos. Estos grupos son los que aparecen con mayores valores de atrapamiento, lo que corrobora los resultados de otros autores (Baroin *et al.*, 1992, 1995, 1998).

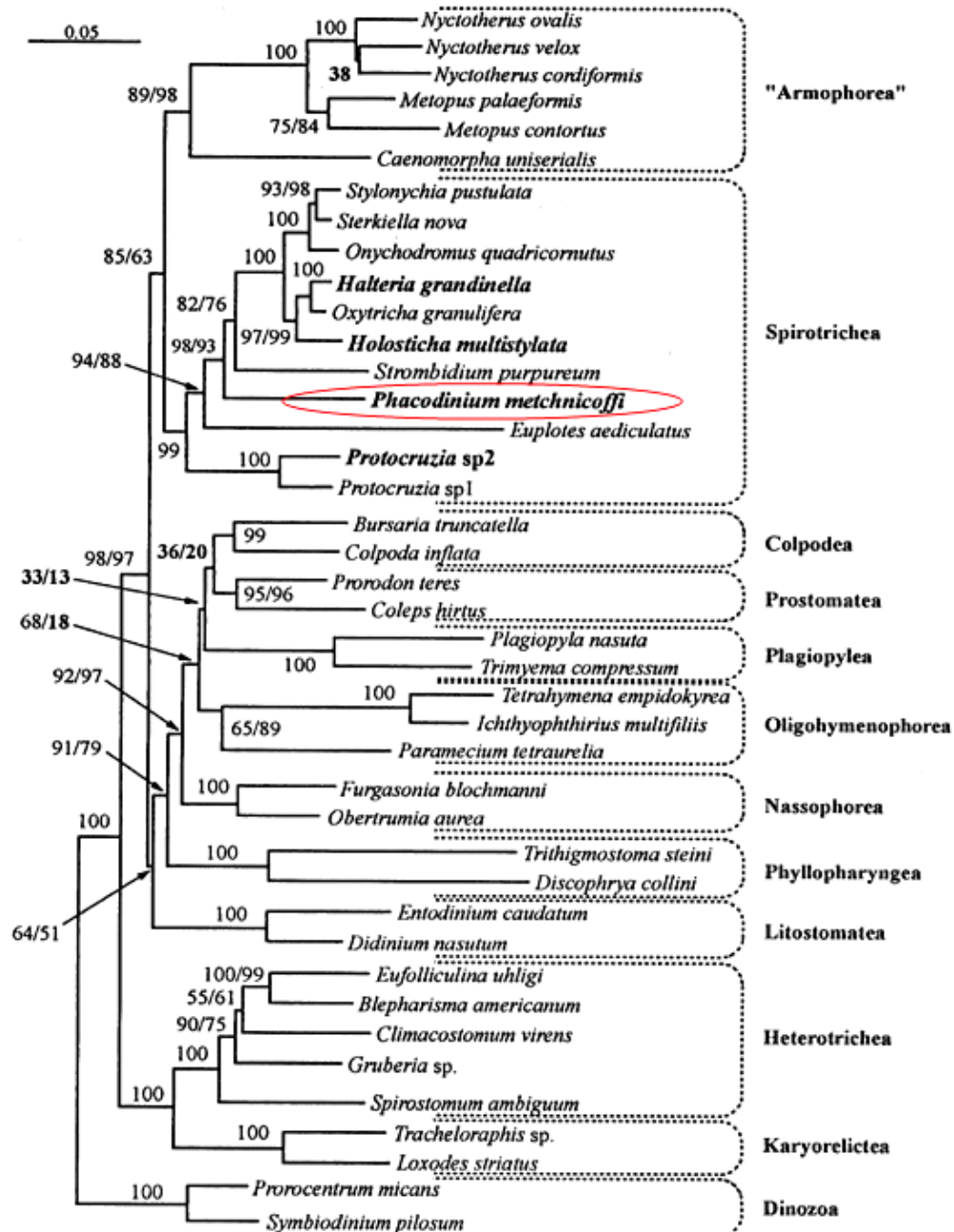
\* En nuestro primer árbol de ARNr 28S (figura 154), *Phacodinium* aparecía sólidamente atrapado con *Uronychia sp.* Pero lo que es más llamativo es que esta rama procede de un tronco que se ha escindido en los euplotidos y en otra rama, que a su vez se escinde en esticotricos, por un lado, y *Phacodinium* y *Uronychia*, por el otro. Cuando el número de secuencias analizadas se incrementó (figs. 155-156), *Uronychia* resultó agrupada con *Euplotidium sp.*, ambos en una línea independiente de *Phacodinium*, que se originaría más tempranamente.

Cuando los estudios moleculares (principalmente con ARNr 18S) centrados en los grupos basales de los ciliados espirotricos (Shin *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2004; Miao *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009) se han ampliado con mayor un mayor número de especies, se han aclarado ciertas posiciones filogenéticas, las cuales se van a discutir, seguidamente, según su orden de aparición en el árbol de los espirotricos:

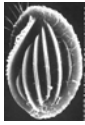
1) La segregación de los protocruzidos se produce en la base de los espirotricos (Hammerschmidt *et al.*, 1996; Shin *et al.*, 2000) y origina un grupo monofilético (**Subclase Protocruziidia**) (fig. 161). El estudio ultraestructural de su cinétida somática, muy parecida a la de *Phacodinium*, y su especial morfogénesis y estructura macronuclear avalan su posición basal. Su separación de los kariorelictidos, donde estaban tradicionalmente situados, indica que la organización macronuclear de *Protocruzia* (con un macronúcleo formado por vesículas independientes que no se fusionan durante la división) puede ser más un carácter derivado que plesiomórfico.



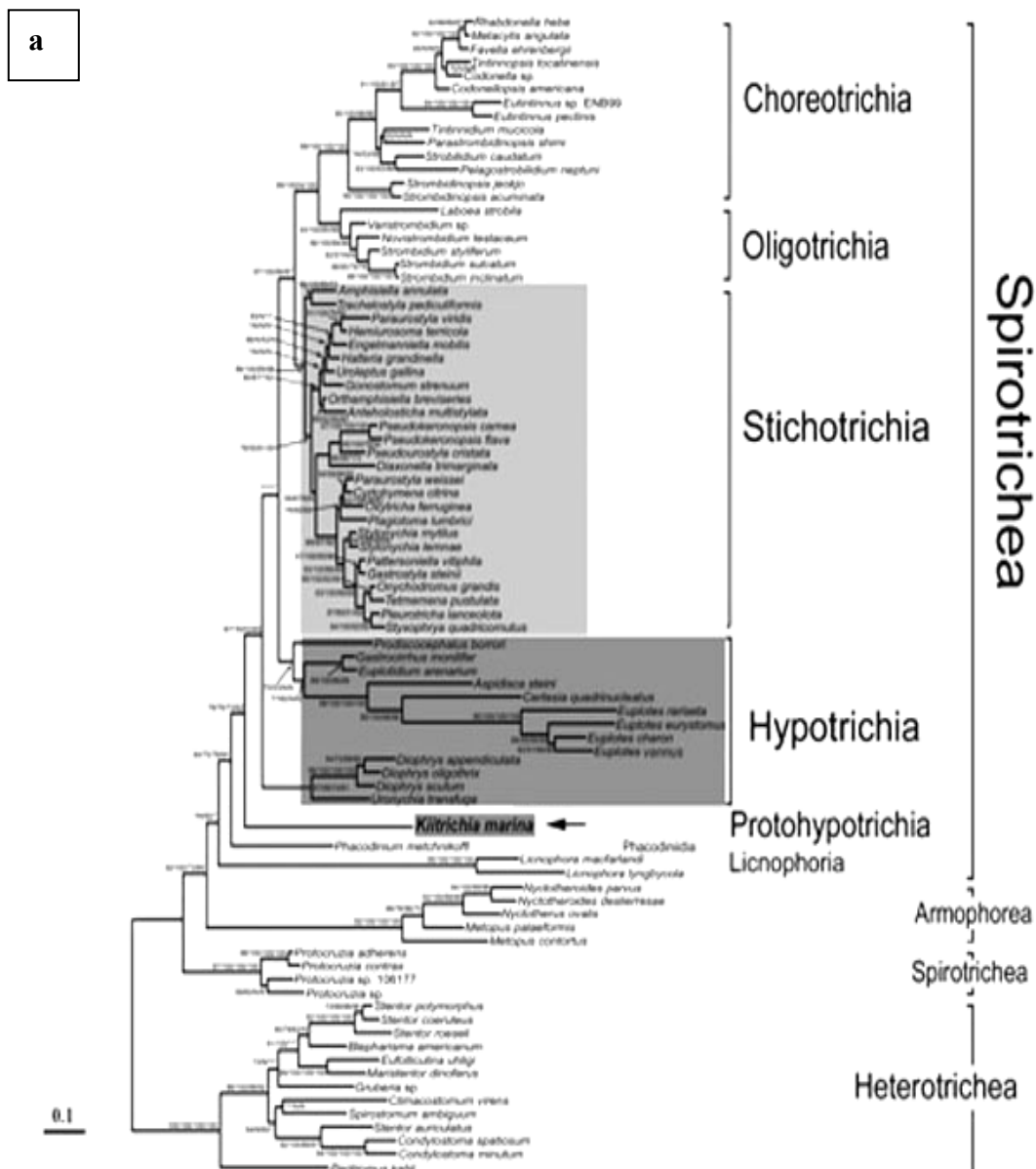
2) La posición de los licnofóridos (Lynn y Strüder-Kypke, 2002), también considerados clásicamente como heterotricos, es la de un grupo que está en la base de los espirotricos, lo que avalan los sucesivos análisis de secuencia del ARNr 18S (Miao *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009). La infraciliación somática de las dicinétidas (da Silva Neto, 1994) y las bandas de replicación en el macronúcleo consolidan su posición filogenética, que aparece siempre como una rama independiente (**Subclase Licnophorida**) y anterior a la de *Phacodinium*.

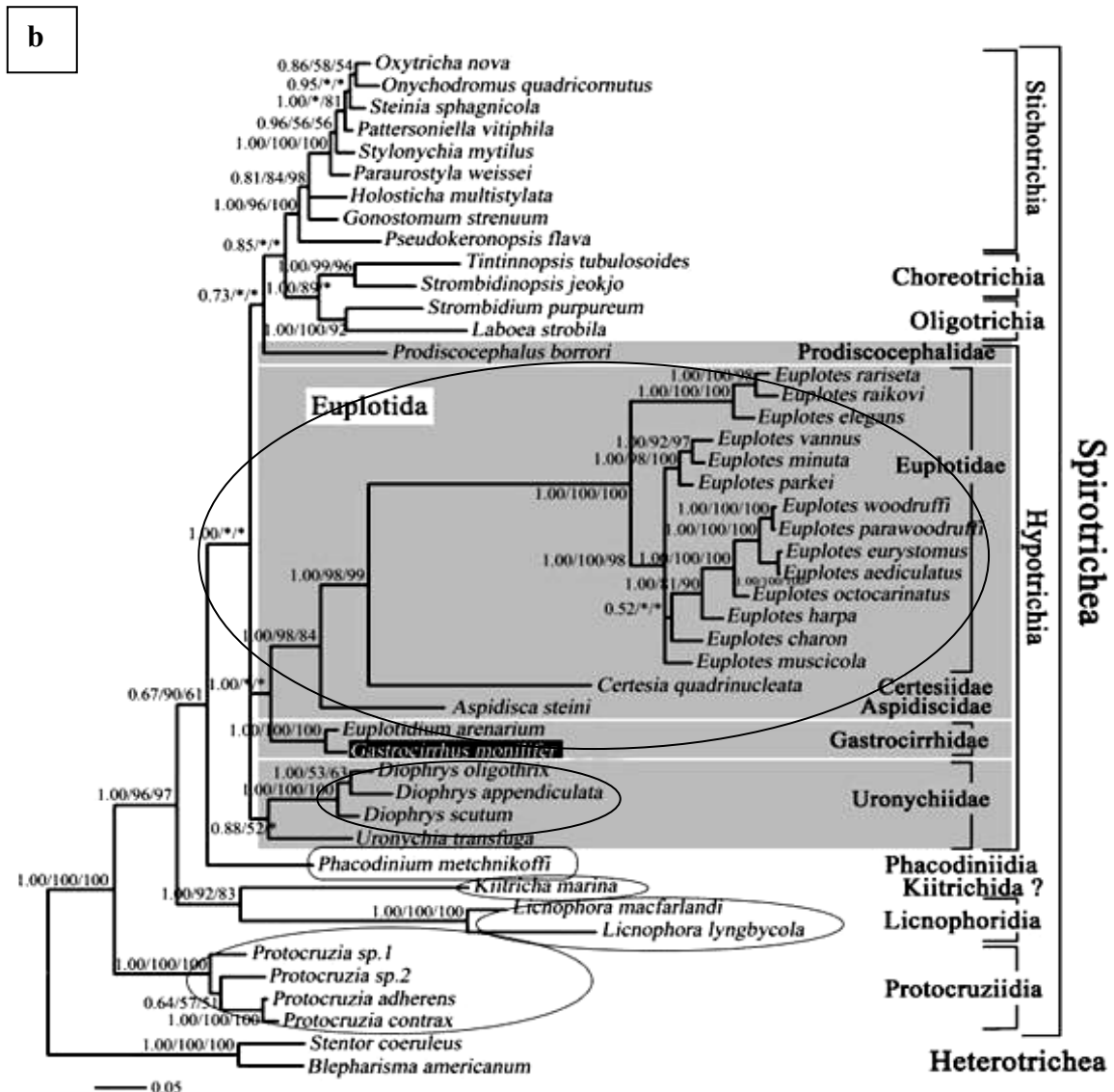
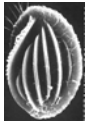


**Fig. 161.** Árbol de matriz de distancia de Shin *et al.* (2000) sobre la filogenia de ciliados basado en la secuencia del ARNr 18S.



3) La posición de *Kiitricha* y *Phacodinium* está firmemente establecida (ambos aparecen sólidamente atrapados) en la base de la subclase Hypotrichia. Aunque todos los estudios de filogenia molecular situaban primero a *Kiitricha* (**Subclase Kiitrichida**) y después a *Phacodinium* como la rama previa a los hipotricos (**Subclase Phacodiniidia**, propuesta por Shin *et al.*, 2000, fig. 161), tal y como se reproduce en el árbol de Miao *et al.* (2007) (fig. 162b) de la que salían el resto de subclases, el último trabajo de Li *et al.* (2009) propone que esta posición sea la de *Kiitricha* en una subclase denominada **Protohypotrichia**, que incluiría también a *Phacodinium*, pero ambos con la categoría taxonómica de familias (fig. 162a).





**Fig. 162 a y b.** Árboles filogenéticos de la secuencia de ARNr 18S: **(a)** según Li *et al.* (2009) y **(b)** según Miao *et al.* (2007). Los valores en los nodos corresponden a estos índices: BI, “índice bayesiano”; ML, “Maximum Likelihood”; LS, “Least Squares”; NJ, “Neighbour-Joining”. En **a)** los valores corresponden a BI/ML/LS/NJ y en **b)** a BI/NJ/LS.

Cuál es la posición relativa de una y otra rama será, seguramente, dilucidada cuando un mayor número de especies se incorpore a esta parte basal del árbol de los espirotricos. A este respecto, cabe mencionar dos especies cuyas características de infraciliación somática y estomatogénesis creemos que pueden situarlas en esta zona del árbol:



- Por un lado, *Plagiotoma*, que tiene una diferenciación dorsoventral (como en los hipotricos), una estomatogénesis paracinetica (como en todos los heterotricos y algunos hipotricos) y bandas de reorganización macronuclear. Fleury *et al.* (1982), al igual que Foissner (1996), creen que es un hipotrico aberrante.
- Por otro lado, *Transitella*, con una infraciliación somática y estomatogénesis muy parecidas a las de *Phacodinium* (como se ha valorado en los subapartados previos de esta discusión), puede ser otro seguro candidato (comunicación personal de Fryd-Versavel e Iftode).

La propuesta de Li *et al.* 2009 sobre la nueva subclase Protohypotrichia, que agruparía a kiitriquidos y phacodiniidos no nos parece sólida, por estas razones:

- Según los autores, la subclase Protohypotrichia se caracterizaría por presentar una ciliación somática constituida, ventralmente, por cirros dispuestos en hileras y, dorsalmente, por cinetias no claramente diferenciadas. También la caracterizaría su único patrón morfogenético intermedio entre hipotricos y esticotricos. Sin embargo, aunque la ultraestructura de los derivados fibrilares somáticos de *Kiitricha* parece más cercana a lo que podría ser un pseudocirro (Fleury *et al.*, 1986) que la que presenta *Phacodinium*, con polidicinetidas, no cuenta con un estudio ultraestructural profundo que lo respalde.
- El estudio morfogenético no está detallado en este trabajo: se publicará, según los autores, más adelante. En cualquier caso, no se hace comparación con el del género *Phacodinium*, puesto hasta su descripción en esta tesis no era conocido.

4) A partir del hipotrico ancestral del grupo 3, se produce la aparición de un nodo común con tres grandes ramas:

- La que conduce a las **subclases Stichotrichia, Choreotrichia y Oligotrichia**, sólidamente establecida (Strüder-Kypke y Lynn, 2003).
- La que conduce a los euplotidos “sensu estricto” (con los géneros de Euplotes y otros situados basalmente en este grupo, como *Certesia*, *Aspidisca*, *Euplotidium* o *Gastrocirrhus*, grupos respaldados por las características infraciliares y moleculares: Chen y Song, 2002; Hu y Song, 2003), más otra rama en la que se agrupan los géneros *Diophrys* y *Uronychia* (Cheng y Song, 2001; Song *et al.*, 2004; Miao *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009). El conjunto forma la **subclase Hypotrichia**.

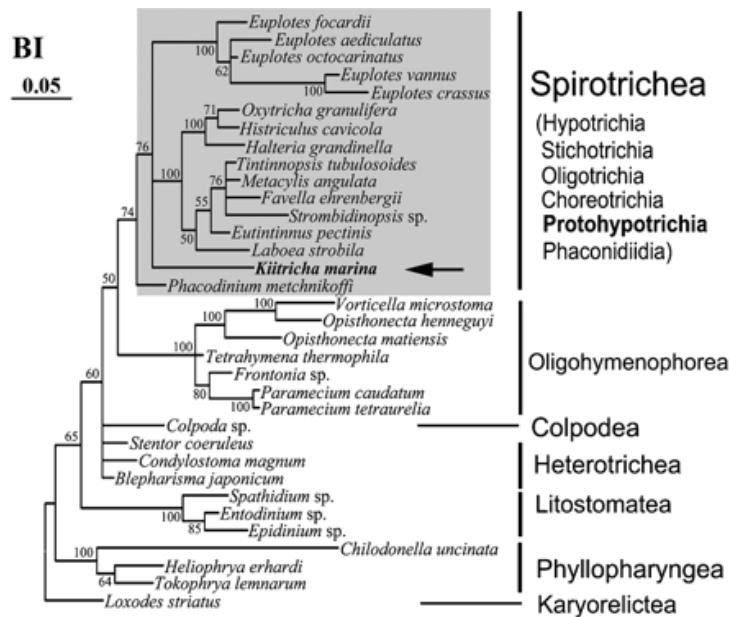
#### 5.4.2. Comparación de los resultados de la secuenciación de $\alpha$ -tubulina

Según nuestros resultados obtenidos con  $\alpha$ -tubulina (fig. 159), *Phacodinium* se separa claramente del resto de los espiotricos y, además, su aparición es más temprana. *Phacodinium* comparte algunas de las marcas “señal” (*hotspots*) en la secuencia aminoacídica de la  $\alpha$ -tubulina con los euplotidos y los espiotricos.





Los estudios de filogenia con  $\alpha$ -tubulina han sido escasos (Baroin *et al.*, 1995; 1998; Li *et al.*, 2009): en los árboles de los primeros autores, no se habían secuenciado todavía la  $\alpha$ -tubulina de *Phacodinium* y la segregación de los espirotricos se hacía en dos ramas, una con euplotidos y otra con el resto de especies. Sin embargo, en el árbol de los segundos autores (fig. 163), la ramificación de *Phacodinium* es la misma que la que aparece en nuestro árbol (fig. 159): la primera del conjunto de los espirotricos, y en ambos casos lo hace con un valores de atrapamiento sólidos (74 y 55, respectivamente).

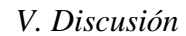


**Fig. 163.** Árbol inferido a partir de la secuencia de aminoácidos de  $\alpha$ -tubulina con las relaciones entre las distintas clases de ciliados (Li *et al.*, 2009). BI: índice bayesiano.

Aunque, como señala Baroin *et al.* (1998), esta proteína no sería adecuada para resolver las relaciones entre grandes taxones, debido al alto grado de conservación de la tubulina en los ciliados y a la posibilidad de que las distintas copias de los genes hayan ocurrido recientemente, después de la divergencia de los grandes grupos, sí podría ser aplicable para resolver distancias entre ciliados próximos o entre especies, y con esta consideración debe utilizarse como marcador filogenético.

El análisis comparativo de todos los resultados moleculares hasta la fecha presenta algunos puntos concluyentes:

- Heterotricos y Espirotricos son dos grupos bien resueltos y representan dos líneas evolutivas independientes.
- Dentro del grupo de los espirotricos, los protocrúzidos y licnofóridos representan líneas evolutivas independientes que emergen de forma temprana.
- Phacodinidos y kiitriquidos se encuentran en la base filogenética del resto de los espirotricos.
- Hipotricos no euplotidos como *Uronychia*, euplotidos (*Euplotes* y *Aspidisca* entre otros), esticotricos, oligotricos y coreotricos presentaron un origen común.



Como se ha repetido a lo largo de esta tesis, es necesario que los estudios filogenéticos moleculares estén respaldados, primero, por la común ultraestructura de los derivados somáticos fibrilares y, segundo, por el proceso de formación del córtex y de la infraciliación durante la morfogénesis.

Phylogenetic tree of the supergroup 'Alveolates' (Alveolados). The tree is rooted at the bottom with 'ANTECESOR ALVEOLADO'. It splits into 'DINOFAGELADOS' and 'KARIORELICTO'. 'DINOFAGELADOS' further splits into 'APICOMPLEXOS' and 'RESTO DE LAS CLASES DE ESPIROTRICOS'. 'KARIORELICTO' splits into 'HETEROTRICHEA' and 'KARIORELICTEA'. 'HETEROTRICHEA' includes 'HYPOTRICHIA' (with subgroups: Stichotrichia, Chrootrichia, Olcotrichia, Euplotids, Hypotrichs, Kinetids, and Tricostids) and 'PROTOHYPOTRICHIA' (with subgroups: Loriciferidia, Protocruzidia, and Tricostididia). 'KARIORELICTEA' includes 'SPIROTRICHEA' (with subgroups: Kinetids, Tricostids, and Tricostididia) and 'KARIORELICTEA' (with subgroups: Kinetids, Tricostids, and Tricostididia).

150

## **VI. CONCLUSIONES**

---



1. *Phacodinium metchnikoffi* presenta un patrón cortical particular dentro Spirotrichea. El córtex celular está reforzado por dos subpoblaciones distintas de haces microtubulares longitudinales: una, originada a partir de los microtúbulos postciliares, que es característica de grupos más primitivos como los heterotricos,; y otra, no relacionada con los cinetosomas, que es característica de los espirotricos, además de la presencia de epiplasma en ambos. Esta organización del córtex indica una aparición temprana dentro de los espirotricos, en la que la hipertrofia de algunos elementos citoesqueléticos todavía no se habría producido.
2. El estudio de la ultraestructura de los elementos ciliares somáticos de *Phacodinium* indica que en esta especie la organización de la ciliación somática responde a un patrón pseudocirral.
3. La estomatogénesis de *Phacodinium* corresponde al tipo poliparacínético según la clasificación de Foissner (1996), lo que puede ser también considerado como un carácter apomórfico, que comparte con grupos más primitivos de los espirotricos y de los heterotricos.
4. Durante la morfogénesis de división de *Phacodinium*, la ciliación somática origina de forma conservativa los nuevos elementos ciliares (cuerpos basales y axonemas ciliares). Poliglutamilación y acetilación son modificaciones postraduccionales que se producen inmediatamente después del proceso de ensamblaje. Las redes corticales e intracitoplásmicas no desaparecen durante el proceso, por lo que podrían contribuir al posicionamiento de los elementos infraciliares.
5. El quiste de *Phacodinium* presenta una pared con cuatro capas y corresponde al tipo NKR según la clasificación de Walker y Mangel (1980). Las características estructurales del quiste no parecen tener valor para establecer relaciones filogenéticas entre especies, si bien podrían ser útiles para definir de forma más precisa los taxones.
6. El análisis comparativo de la secuencia de ARNr 28S y  $\alpha$ -tubulina indica, en ambos casos, una posición basal de *Phacodinium* entre los espirotricos. Los árboles resultantes de dichos análisis son congruentes para los grandes grupos dentro de los espirotricos, aunque, en los taxones inferiores, serían necesarios nuevos datos, como pueden ser los de las secuencias de *Transitella* o de *Plagiotoma*.
7. En el análisis comparativo de la ontogénesis de *Phacodinium*, éste se segrega junto con *Transitella*. Dadas las divergencias entre ambas especies, posiblemente representan líneas filogenéticas independientes.
8. La estructura más conservada entre los ciliados es la de la cinétida somática, por lo que es necesario aportar nuevos datos ultraestructurales para proponer definitivamente los diferentes taxones en los sistemas de clasificación. De forma secundaria, pueden utilizarse el número de cinetosomas por cinétida y la

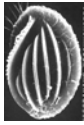


infraciliación oral como caracteres en taxones ya establecidos en función de la estructura común de la cinétida somática.

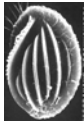
9. La ultraestructura bucal puede ser útil en los estudios filogenéticos, fundamentalmente en lo que respecta a la disposición de los derivados fibrilares en la formación paroral. El resto pueden ser caracteres convergentes.
10. Los datos moleculares son una herramienta idónea para afianzar taxones fuertemente establecidos por los datos ultraestructurales y ontogenéticos o para determinar la posición de géneros “*incertis sedis*”. También son válidos para aclarar la polaridad del estado de un carácter somático (plesiomórfico versus regresión evolutiva) en taxones inferiores. Sin embargo, no pueden por sí solos determinar las posiciones filogenéticas de las especies.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

---



- Adoutte, A., Claisse, M., Maunoury, R. and Beisson, J.** 1985. Tubulin evolution: Ciliate-specific epitopes are conserved in the ciliary tubulin of metazoa. *J. Mol. Evol.*, 22: 220-229.
- Adoutte, A., Delgado, P., Fleury, A., Levilliers, N., Lainé, M.C., Marty, M.C., Boisvieux-Ulrich, E. and Sandoz, D.** 1991. Microtubule diversity in ciliated cells: evidence for its generation by post-translational modification in the axonemes of *Paramecium* and quail oviduct cells. *Biol. Cell.*, 71: 227-245.
- Adoutte, A., Germot, A., Le Guyader, H. et Philippe, H.** 1996. Que savons-nous de l'histoire évolutive des eucaryotes?. De la diversification des protistes à la radiation des multicellulaires. *Société Française de Génétique*, 12: 1-17.
- Allen, S. L. and Gibson, I.** 1973. Genetics of *Tetrahymena*. En Elliott, A. M. (ed.), *Biology of Tetrahymena*, Dowden, Hutchinson and Ross Inc., Stroudsburg, PA. pp. 307-373.
- Arregui, L.** 1999. Citoesqueleto microtubular del ciliado psicrófilo *Euplotes focardii*: organización, isotipos y modificaciones postraduccionales de tubulina. Tesis doctoral. Univ. Complutense. Madrid.
- Arregui, L., Serrano, S. and Guinea, A.** 1994. Microtubular elements of the marine antartic ciliate *Euplotes focardii* (Ciliophora, Hypotrichia). *Arch. Protistenkd.*, 144: 357-364.
- Augustin, H., Foissner, W. and Adam, H.** 1984. An improved pyridinated silver carbonate method which needs few specimens and yields permanent slides of impregnated ciliates (Protozoa, Ciliophora). *Mikroskopie*, 41: 134-137.
- Bailly, E., Berger, J., Borders, N., Celati, C. and Bornens, M.** 1988. Analysis of centrosomal components with monoclonal antibodies. En "Structure and functions of the cytoskeleton: biological and physiopathological aspects". Ed. B.A.F. Rousset. Colloque INSERM, Vol. 171, p.143. Libbey, London.
- Bardele, C.F.** 1989. From ciliate ontogeny to ciliate phylogeny: a program. *Boll. Zool.*, 56: 235-244.
- Bardele, C.F.** 1999. The new systematics of protists. Conferencia pronunciada en el "3rd European Congress of Protistology and 9th Conference on Ciliate Biology". Copenhagen, Dinamarca.
- Baroin, A., Perasso, R., Qu, L.H., Brugerolle, G., Bachellerie, J.P. and Adoutte, A.** 1988. Partial phylogeny of the unicellular eukaryotes based on rapid sequencing of a portion of 28S ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85: 3474-3478.
- Baroin-Tourancheau, A., Delgado, P., Perasso, R. and Adoutte, A.** 1992. A broad molecular phylogeny of ciliates: Identification of major evolutionary trends and radiations within the phylum. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 89: 9764-9768.



- Baroin-Tourancheau, A., Tsao, N., Klobutcher, L.A., Pearlman, R.E. and Adoutte, A.** 1995. Genetic code deviations in the ciliates: evidence for multiple and independent events. *EMBO J.*, 14: 3262-3267.
- Baroin-Tourancheau, A., Villalobo, E., Tsao, N., Torres, A. and Pearlman, R.** 1998. Protein coding gene trees in ciliates: phylogenetic analyses of alpha-tubulin and phosphoglycerate kinase gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 10: 299-309.
- Bernhard, D., Leipe, D.D., Sogin, M.L., and Schlegel, M.** 1995. Phylogenetic relationships of the Nassulida within the phylum ciliophora inferred from the complete small subunit rRNA gene sequences of *Furgasonia blochmanni*, *Obertruria georgiana* and *Pseudomicrotorax dubius*. *J. Euk. Microbiol.*, 42: 126-131.
- Bernhard, D., Stechmann, A., Foissner W., Ammermann, D., Hehn M. and Schlegel, M.** 2001. Phylogenetic relationships within the class Spirotrichea (Ciliophora) inferred from small subunit rRNA gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 21: 86-92.
- Borror, A.C.** 1972. Revision of the order Hypotrichida (Ciliophora, Protozoa). *J. Protozool.*, 19: 1-23.
- Bré, M.H., de Néchaud, B., Wolff, A. and Fleury, A.** 1994. Glutamylated tubulin probed in ciliates with the monoclonal antibody GT335. *Cell Motil. Cytoskel.*, 27: 337-349.
- Bré, M.H., Kreis, T.E. and Karsenti, E.** 1987. Control of microtubule nucleation and stability in Madin-Darby canine kidney cells: the occurrence of noncentrosomal, stable detyrosinated microtubules. *J. Cell. Biol.*, 105: 1283-1296.
- Bré, M.H., Redeker, V., Vinh, J., Rossier, J. and Levilliers, N.** 1998. Tubulin polyglycylation: differential post-translational modification of dynamic cytoplasmic and stable axonemal microtubules in *Paramecium*. *Mol. Biol. Cell.*, 9: 2655-2665.
- Bulinski, J.C. and Gundersen, G.G.** 1991. Stabilization and posttranslational modification of microtubules during cellular morphogenesis. *BioEssays*, 13: 285-293.
- Bütschli, O.** 1889. Protozoa. III. Abtheilung: Infusoria und system der Radiolaria. En: Bronn, H.G. (Ed.), Klassen und Ordnungen des Thier-Reichs, wissenschaftlich dargestellt in Wort und Bild. Winter, Leipzig. pp. 1585-2035.
- Callen, A.M., Adoutte, A., Andreu, J.M., Baroin-Tourancheau, A., Bré, M.H., Calvo Ruiz, P., Cijrot, J.C., Delgado, P., Fleury, A., Jeanmaire-Wolf, R., Viklicky, V., Villalobo, E. and Levilliers, N.** 1994. Isolation and characterization of libraries of monoclonal antibodies directed against various forms of tubulin in *Paramecium*. *Biol. Cell.*, 81: 95-119.
- Calvo, P.** 1989. Redescrípción de *Phacodinium metchnikoffi* y consideraciones sobre la filogenia de los hipotricos. Tesina de Licenciatura. Departamento de Microbiología III. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.

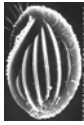




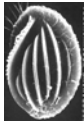
- Calvo, P., Serrano, S., Fernández -Galiano, D., Arregui L. and Campos, I.** 1992. Ultrastructural aspects of the mature resting cyst and encystment process in *Phacodinium metchnikoffi*. *Europ. J. Protistol.*, 28: 334.
- Calvo, P. y Serrano, S. y Fernández -Galiano, D.** 1995. Estudio inmunocitoquímico de los elementos citoesqueléticos en el ciliado *Phacodinium metchnikoffi*. XV Congreso de la Sociedad Española de Microbiología, Madrid.
- Calvo, P. y Serrano, S.** 2004. Clasificación filogenética de ciliados: criterios moleculares versus morfológico-morfogenéticos (Organización cortical). V Reunión de Protozoología de la SEM, Granada.
- Cavalier-Smith, T.** 1993. Kingdom Protozoa and its 18 phyla. *Biol. Rev.*, 57: 953-993.
- Certes, A.** 1891. Note sur deux infusoires nouveaux des environs de Paris. *Mémoires de la Société Zoologique*. Tomo IV: 536-541.
- Chatton, E. et Lwoff, A.** 1930. Imprégnation par diffusion argentique, de l'infraction ciliature des ciliés marins et d'eau douce, après fixation cytologique et sans desiccation. *Comp. Rend. Soc. Biol.*, 104: 834-836.
- Chen Z. and Song, W.** 2001. Phylogenetic positions of *Uronychia transfuga* and *Diophrys appendiculata* (Euplotida, Hypotrichia, Ciliophora) within hypotrichous ciliates inferred from the small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Europ. J. Protistol.*, 37: 291-301.
- Chen, Z. and Song, W.** 2002. Phylogenetic positions of *Aspidisca steini* and *Euplotes vannus* within the Order Euplotida (Hypotrichia: Ciliophora) Inferred from Complete Small Subunit Ribosomal RNA Gene Sequences. *Acta Protozool.*, 41:1-9.
- Cohen, J. and Beisson, J.** 1988. The cytoskeleton. En: "*Paramecium*" Ed. Görtz, H.D. Heidelberg, Springer Verlag. pp. 363-392.
- Corliss, J.O.** 2004. Why the world needs Protists!. *J. Euk. Microbiol.*, 51: 1-8.
- Corliss, J.O.** 1961. The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification, and Guide to the Literature. Pergamon Press, New York.
- Corliss, J.O.** 1973. History, taxonomy, ecology, and evolution of species of *Tetrahymena*. In: *The Biology of Tetrahymena*, A.M. Elliott, Editor Dowden, Hutchinson y Ross, Stroudsburg, pp. 1-55.
- Corliss, J.O.** 1974. The changing world of ciliate systematics: historical analysis of past efforts and a newly proposed phylogenetic scheme of classification for the protistan phylum Ciliophora. *Syst. Zool.*, 23: 91-138.
- Corliss, J.O.** 1979. The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification and Guide to the Literature. 2<sup>nd</sup> ed. Pergamon Press, Oxford and New York.



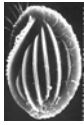
- Delgado, P. and Fleury, A.** 1993. Comparison of the electrophoretic behaviour of tubulins from distantly related species ciliates. *Europ. J. Protistol.*, 29: 176-181.
- Delgado, P., Calvo, P. and Torres, A.** 1987. Encystment in the hypotrichous ciliate *Paraurostyla weissei*. Ultrastructure and citochemistry. *J. Protozool.*, 34: 104-110.
- Delgado-Viscogliosi, P., Brug erolle, G. and Viscogliosi, E .** 1996. Tubulin post-translational modifications in the primitive protist *Trichomonas vaginalis*. *Cell Motil. Cytoskel.*, 33: 288-297.
- Denoulet, P., Eddé, B., Pinto-Henrique, D., Ko ulakoff, A., Berwald-Netter, Y. and Gros, F .** 1988. The increase of tubulin heterogeneity during differentiation of neurons in primary culture is controlled mainly at the posttranslational level. In: "Structure and Functions of the Cytoskeleton." Rousset, B.A.F. (ed), Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd., Londres, Paris. 171: 231-237.
- Deroux, G. et Tuffrau, M.** 1965. *Aspidisca orthopogon* n. sp. Révision de certains mécanismes de la morphogenèse a l'aide d'une modification de la technique au protargol, *Cah. Biol. Mar.*, 6: 293-310.
- Deveraux, J., Haeberli, P. and Smithies, O.** 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic. Acids. Res.*, 12: 387-395.
- Didier, P. et Dragesco, J.** 1976. Quelques particularités ultrastructurales de *Phacodinium metchnikoffi* (Ciliophora, Polyhymenophora, Heterotricha). *J. Protozool.*, 23: 9<sup>a</sup>.
- Didier, P. et Dragesco, J.** 1979a. Organisation ultrastructurale du cortex de *Phacodinium metchnikoffi* (Cilié hétérotriche). *Protistologica*, 15: 33-42.
- Didier, P. et Dragesco, J.** 1979b. Organisation ultrastructurale du cortex des vacuoles digestives de *Phacodinium metchnikoffi* (Cilié hétérotriche). *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, 98: 385-392.
- Dower, G.E., Yakush, A., Nazzal, S.B., Jutzy, R.V. and Ruiz, C.E.** 1988. Deriving the 12-lead electrocardiogram from four (EAASI) electrodes. *J. Electrocardiol.*, 21: 182-187.
- Dragesco, J.** 1970. Ciliés libres du Cameroun. Num. Hors-Série. *Ann. Fac. Sci.*, Yaoundé, pp. 1-141.
- Dragesco, J. et Dragesco-Kernéis, A.** 1986. Ciliés Libres de l'Afrique Intertropicale. Faune Tropicale 26. Orstom, Paris.
- Drouin, G., Moniz de Sá, M. and Z ucker, M.** 1995. The *Giardia lamblia* actin gene and the phylogeny of eukaryotes. *J. Mol. Evol.*, 41: 841-849.
- Dupuis-Williams, P., Klotz, C., Maz arguil, H. and Beisson, J.** 1996. The tubulin gene family of *Paramecium*: Characterization and expression of the  $\alpha$ PT1 and  $\alpha$ PT2 genes which



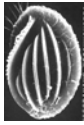
- code for  $\alpha$ -tubulins with unusual C-terminal amino acids, GLY and ALA. *Biol. Cell.*, 87: 83-93.
- Ehret, C.F.** 1960. Organelle systems and biological organization. *Science*, 132: 115-123.
- Eisler, K.** 1992. Somatic kinetics or paroral membrane: which came first in ciliate evolution? *BioSystems*, 26: 239-254.
- Eisler, K.** 1995. The paroral membrane, its implication in morphogenesis, and its importance in ciliate evolution pp. 107-113. *Protistological Actualities (Proceedings of the Second European Congress of Protistology Clermont-Ferrand)*.
- Fauré-Fremiet, E.** 1950. Morphologie comparée et systématique des ciliés. *Bull.Soc.Zool.*, France 75: 109-122.
- Fauré-Fremiet, E.** 1961. Remarques sur la morphologie comparée et la systématique des Ciliata Hypotrichida. *C. R. Hébd. Séanc. Acad. Sci.*, Paris 252: 3515-3519.
- Fauré-Fremiet, E.** 1970. À propos de la note de M. Thomas Njiné sur le cilié *Loxodes magnus*. *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D*, 270: 523-524.
- Felsenstein, J.** 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Fernández-Galiano, D.** 1976. Silver impregnation of the ciliated protozoa: procedure yielding good results with the silver carbonate method. *Trans. Amer. Micros. Soc.*, 95: 557-560.
- Fernández-Galiano, D.** 1966. Algunas modificaciones y nuevas precisiones sobre el método de impregnación en masa de los ciliados por el carbonato de plata. *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. (Biol)*, 64: 95-98.
- Fernández-Galiano, D.** 1979. Transfer of the widely known "spirotrich" ciliate *Bursaria truncatella* O.F.M. to the Vestibulifera as a separate order there, the Bursariomorphida. *Trans. Amer. Micros. Soc.*, 98: 447-454.
- Fernández-Galiano, D.** 1994. The ammoniacal silver carbonate method as a general procedure in the study of protozoa from sewage (and other) waters. *Wat. Res.*, 28: 495-496.
- Fernández-Galiano, D. y Calvo, P.** 1992. Redescription of *Phacodinium metchnikoffi* (Ciliophora, Hypotrichida): General Morphology and Taxonomic Position. *J. Protozool.*, 39: 443-448.
- Fleury, A.** 1988. The use of correlated ultrastructural and morphogenetic characters in evolutionary taxonomy of hypotrich ciliates. *BioSystems*, 21: 309-316.
- Fleury, A.** 1991a. Dynamics of the cytoskeleton during morphogenesis in the ciliate *Euplotes*. I. Basal bodies related microtubular system. *Europ. J. Protistol.*, 27: 99-114.



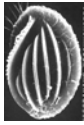
- Fleury, A.** 1991b. Dynamics of the cytoskeleton during morphogenesis in the ciliate *Euplotes*. II. Cortex and continuous microtubular systems. *Europ. J. Protistol.*, 27: 220-237.
- Fleury, A., Delgado, P., Iftode, F. and Adoutte, A.** 1992. A molecular phylogeny of ciliates: What does it tell us about the evolution of the cytoskeleton and of developmental strategies? *Develop. Genetics*, 13: 247-254.
- Fleury, A. et Fryd-Versavel, G.** 1982. *Plagiotoma*: un Hypotrichide? *J. Protozool.*, 29: 167.
- Fleury, A., Iftode, F., Deroux, G., Fryd-Versavel, G. et Générmont, J.** 1985. Relation entre caractères ultrastructuraux et morphogénétiques chez les Hypotriches (Protozoa Ciliata): définition des Eupotrichina n. S.O. et des Pseudohypotrichina n.S.O. *C. R. Acad. Sci.*, Paris 300 (sér. III): 567-570.
- Fleury, A., Iftode, F., Deroux, G. et Fryd-Versavel, G.** 1986. Unité et diversité chez les hypotriches (Protozoaires ciliés): III.- Éléments d'ultrastructure comparée chez divers représentants du sous-ordre des pseudohypotrichina et remarques générales. *Protistologica*, 23: 65-87.
- Fleury, A., Le Guyader, H., Iftode, F., Laurent, M. and Bornens, M.** 1993. A scaffold for basal body patterning revealed by a monoclonal antibody in the hypotrich ciliate *Paraurostyla weissei*. *Develop. Biol.*, 157: 285-302.
- Fleury, A. and Laurent, M.** 1994. Transmission of surface pattern through a dedifferentiated stage in the ciliate *Paraurostyla*. Evidence from the analyses of microtubule and basal body deployment. *J. Euk. Microbiol.*, 41: 276-291.
- Fleury, A., Philippe, H. and Baroin, A.** 1995. Cortical organization and molecular phylogeny. *Protistological Actualities* pp. 104-107 (Proceedings of the Second European Congress of Protistology Clermont-Ferrand).
- Foissner W.** 1992. Estimating the species richness of soil protozoa using the "non-flooded petri dish method". En: "*Protocols in Protozoology*" (Eds. J.J. Lee y A.T. Soldo). Society of Protozoologists, Alien Press, Lawrence, Kansas. B-10.1 a B-10.2.
- Foissner, W.** 1993. Colpodea (Ciliophora). En: Mathes D. (ed) *Protoenfauna*, vol 4/1. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Foissner, W.** 1996. Ontogenesis in ciliated protozoa, with emphasis on stomatogenesis. In: *Ciliates, Cells as Organisms* (Eds. K. Hausmann y P.C.Bradbury), pp. 95-177. Gustav-Fischer, Stuttgart.
- Frankel, J.** 1989. *Pattern Formation: Ciliate Studies and Models*. Oxford University Press, New York.
- Gagnon, C., White, D., Cosson, J., Huitorel, P., Eddé, B., Desbruyères, E., Paturle-Lafanechère, L., Multigner, L., Job, D. and Cibert, C.** 1996. The polyglutamylated lateral chain of  $\alpha$ -tubulin plays a key role in flagellar motility. *J. Cell. Sci.*, 109: 1545-1553.



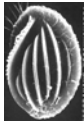
- Gelei, J. und Horváth, P.** 1931. Eine nasse Silber-bzw Gold methode für die Herstellung der reizleitenden Elemente bei den Ciliaten. *Z. Wiss. Mikrosk.*, 48: 9-29.
- Gerassimova, Z.P. and Seravin, L.N.** 1976. Ectoplasmic fibrillar system of Infusoria and its role for the understanding of their phylogeny. *Zool. Zh.*, 55: 645-656.
- Giambelluca, M.A., Gabrielli, S., Erra, F. and Rosati, G.** 1995. Morphogenetic study during cell division in *Euplotidium itoi* (Ciliata, Hypotrichida). *Europ. J. Protistol.*, 31: 286-291.
- Golinska, K.** 1992. Cortical organellar complexes, their structure, formation and bearing upon cell shape in a ciliate, *Dileptus*. *Protoplasma*, 162:160-174.
- Grain, J.** 1995. Comments on phylogenetic trees reconstructed from non-molecular data, and on the origin of ciliates. *Protistological Actualities*, pp. 116-123 (Proceedings of the Second European Congress of Protistology, Clermont-Ferrand).
- Greenwood, S.J., Schegel M., Sogin, M.L. and Lynn D.H.** 1991a. Phylogenetic relationship of *Blepharisma americanum* and *Colpoda inflata* within the phylum Ciliophora inferred from complete small subunit rRNA gene sequences, *J. Protozol.*, 38:1-6.
- Greenwood, S.J., Sogin, M.L. and Lynn D.H.** 1991b. Phylogenetic relationships within the class Oligohymenophorea, Phylum Ciliophora, inferred from the complete small subunit rRNA gene sequences of *Colpidium campylum*, *Glaucoma chattoni* and *Opisthonecta henneguyi*. *J.Mol. Evol.*, 33: 163-174.
- Grim, J.N. and Manganaro, C.A.** 1985. Form of the extrusomes and secreted material of the ciliate protozoon *Pseudourostyla cristata*, with some phylogenetics interpretations: a light, scanning electron, and transmission electron microscopic study. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 104: 350-359.
- Grolière, C.A., de Puytorac, P. et Detcheva, R.** 1980. A propos d'observations sur la stomatogenèse et l'ultrastructure du cilié *Protocruzia tuzeti* Villeneuve-Brachon, 1940. *Protistologica*, 26: 453-466.
- Gutiérrez, J.C., Díaz, S., Ortega, R. and Martín-González, A.** 2003. Ciliate resting cyst walls: a comparative review. *Recent Res. Devel. Microbiol.*, 7: 361-379.
- Haeckel, E.** 1866. Generelle Morphologie der Organismen: Allgemeine Grundzüge der organischen Formen-Wissenschaft, mechanisch begründet durch die von Charles Darwin reformirte Descendenz-Theorie. Georg Reimer, Berlin, Germany.
- Hammerschmidt, B., Schlegel, M., Lynn, D.H., Leipe, D., Sogin, M.L. and Raikov, I.B.** 1996. Insights into the evolution of nuclear dualism in the ciliates revealed by phylogenetic analysis of rRNA sequences. *J. Euk. Microbiol.*, 43: 225-230.



- Hill, B.F.** 1990. *Uronychia transfuga* (O.F. Müller, 1786) Stein, 1859 (Ciliophora, Hypotrichida, Uronychidae): cortical structure and morphogenesis during division. *J. Protozool.*, 37: 99-107.
- Hirt, R.P., Dyal, P.L., Wilkinson, M., Finlay, B.J., Roberts, D.McL. and Embley, T.M.** 1995. Phylogenetic relationships among karyorelictids and heterotrichs inferred from small subunit rRNA sequences: Resolution at the base of the ciliate tree. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 4: 77-87.
- Holtke, H.J., Seibl, R., Gebhard, W. and Kabsch, W.** 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature*, 347: 44-49.
- Hu, X. and Song, W.** 2003. Redescription of two known species, *Gastrocirrhus monilifer* (Ozaki et Yagiu, 1942) and *Gastrocirrhus stentoreus* Bullington, 1940, with reconsideration of the Genera *Gastrocirrhus* and *Euplotidium*. *Acta Protozool.*, 42: 345-355.
- Iftode, F., Fryd-Versavel, G. and Cury, J.J.** 1982. *Copemetopus* Villeneuve duplication and reorganization of cortical cytoskeletal structure in the wild type. *Development*, 105: 191-211.
- Iftode, F., Fryd-Versavel, G., Wicklow, B. et Tuffrau, M.** 1983. Le genre *Transitella*: stomatogenèse, ultrastructure. Affinités de la famille des Transitellidae. *Protistologica*, 1: 21-39.
- Iftode, F., Cohen J., Ruiz, F., Torres-Rueda, A., Chen-Chan, L., Adoutte, A. and Beisson, J.** 1989. Development of surface pattern division in *Paramecium*. I. Mapping of duplication and reorganization of cortical cytoskeletal structure in the wild type. *Development*, 105: 191-211.
- Iftode, F., Fleury, A. and Adoutte, A.** 1997. Development of surface pattern during division in *Paramecium*. III. Study of stomatogenesis in the wild type using antitubulin antibodies and confocal microscopy. *Europ. J. Protistol.*, 33: 145-167.
- Iftode, F., Clérot, J.C., Levilliers, N. and Bré, M.H.** 2000. Tubulin polyglycylation: a morphogenetic marker in ciliates. *Biol. Cell*, 92: 615-628.
- Innis, M.A., Myambo, K.B., Gelfand, D.F. and Brown, M.A.D.** 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Sci.*, 85: 9436-9440.
- Jankowski, A.W.** 1967. A new system of ciliate Protozoa (Ciliophora). Akad. Nauk. SSSR, *Trudy. Zool. Inst.*, 43: 3-54.
- Jeanmaire-Wolf, R., Clérot, J.C., Nahon, P., Iftode, F., Fleury, A. and Adoutte, A.** 1993. Isolation and characterization of monoclonal antibodies to cytoskeletal and membrane proteins of the *Paramecium* cortex. *Europ. J. Protistol.*, 29: 311-333.

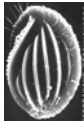


- Kahl, A.** 1932. Urtiere oder Protozoa I: Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria). En: Dahl, F. (de.), Die Tierwelt Deutschlands, G. Fisher, Jena.
- Kann, M.L., Prigent, Y., Levilliers, N., Bré, M.H. and Fouquet, J.P.** 1998. Expression of glycylation of tubulin during the differentiation of spermatozoa in mammals. *Cell. Motil. Cytoskel.*, 41: 341-352.
- Keeling, P. J. and Doolittle, W. F.** 1996. Alpha-tubulins from early-diverging lineages: the divergence and evolution of the tubulin family. *Mol. Biol. Evol.*, 13: 318-326.
- Kimura, M.** 1980. A simple method of estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16: 111-120.
- Klein, B.M.** 1926. Ergebnisse mit einer Silbermethode bei Ciliaten. *Arch. Protistenk.*, 56: 243-279.
- Klobutcher, L.A. and Farabaugh, P.J.** 2002. Shifty ciliates: frequent programmed translational frameshifting in euplotids. *Cell*, 111: 763-766.
- Kuidong, X., Yanli, L. and Joong, K.** 2008. *Kiitricha minuta* n. sp., a peculiar hypotrichous ciliate (Ciliophora, Spirotrichea) from the yellow sea. *J. Euk. Microbiol.*, 55: 201-206.
- Laurent, M., Johannin, G., Leguyader, H. and Fleury, A.** 1992. Confocal scanning optical microscopy and 3-dimensional imaging. *Biol. Cell*, 76: 113-124.
- Lei, Y., Choi, J.K. and Xu, K.** 2002. Morphology and infraciliature of a new marine ciliate *Euplotidium smalli* n. sp. with description of a new genus *Paraeuplotidium* n.g. (Ciliophora, Euplotida). *J. Euk. Microbiol.*, 49: 402-406.
- Leipe, D.D., Bernhard, D., Schlegel, M. and Sogin, M.L.** 1994. Evolution of 16S-like ribosomal RNA genes in the ciliophoran taxa Litostomatea. *Eur. J. Protistol.*, 30: 354-361.
- Levilliers, N., Fleury, A. and Hill, A.M.** 1995. Monoclonal and polyclonal antibodies detect a new type of post-translational modification of axonemal tubulin. *J. Cell. Sci.*, 108: 3013-3028.
- Levine, N.D., Corliss, L.O., Cox, F.E.G., Deroeux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D.H., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. and Wallace, F.G.** 1980. A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.*, 27: 37-58.
- Li, L., Shao, C., Song, W., Lynn, D.H., Chen, Z. and Shin, M.K.** 2009. Does *Kiitricha* (Protista, Ciliophora, Spirotrichea) belong to Euplotida or represent a primordial spirotrichous taxon? With suggestion to establish a new subclass Protohypotrichia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59: 439-446.

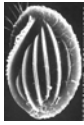


- Lynn, D.H.** 1976. Comparative ultrastructure and systematics of the Colpodida. Structural conservatism hypothesis and a description of *Colpoda steinii* Maupas. *J. Protozool.*, 23: 302-314.
- Lynn, D.H.** 1979. Changes in the classification of several major taxa of Ciliophora on the basis of a numerical phenetic analysis. *J. Protozool.*, 26: 359-367.
- Lynn, D.H.** 1981. The organization and evolution of microtubular organelles in ciliated protozoa. *Biol.Rev.*, 56: 243-292.
- Lynn, D.H.** 1991. The implications of recent descriptions of kinetid structure to the systematics of the ciliated protists. *Protoplasma*, 164: 123-142.
- Lynn, D.H.** 1996. My journey in ciliates systematics. *J. Euk. Microbiol.*, 43: 253-260.
- Lynn, D.H.** 2003. Morphology or molecules: How do we identify the major lineages of ciliates (Phylum Ciliophora)? *Europ. J. Protistol.*, 39: 356-364.
- Lynn, D.H. and Corliss, J.O.** 1991. Ciliophora. En: Microscopic Anatomy of Invertebrates, Vol 1: Protozoa (Wiley-Liss, New York), Vol.1, pp. 333-467.
- Lynn, D.H. and Small, E.B.** 1981. Protist kinetids: structural conservatism, kinetid structure and ancestral states. *BioSystems*, 14: 377-385.
- Lynn, D.H. and Small, E.B.** 1988b. An update of the systematics of the phylum ciliophora Doflein, 1901: the implications of the kinetid diversity. *BioSystems*, 21: 317-322.
- Lynn, D.H. and Small, E.B.** 1997. A revised classification of the phylum Ciliophora Doflein, 1901. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*, 47: 65-78.
- Lynn, D.H. and Small, E.B.** 2000. Phylum Ciliophora Doflein, 1901. In: The Illustrated Guide to the Protozoa (Eds. J.J., Lee, G.F., Leedale, P.C., Bradbury), 2<sup>nd</sup> ed, Society of Protozoologists, Allen Press, Lawrence, Kansas, pp. 371-656.
- Lynn, D.H. and Sogin, M.L.** 1988a. Assessment of the phylogenetic relationships among ciliated protists, using partial ribosomal RNA sequences derived from reverse transcripts. *BioSystems*, 21: 249-254.
- Lynn, D.H. and Strüder-Kypke, M.** 2002. Phylogenetic position of *Licnophora*, *Lechriopyla*, and *Schizocaryum*, three unusual ciliates (Phylum Ciliophora) endosymbiotic in echinoderms (Phylum Echinodermata). *J. Euk. Microbiol.*, 49: 460-468.
- Martín-González, A., Benítez, L. and Gutiérrez, J.C.** 1991. Cortical and nuclear events during cell division and resting cyst formation in *Colpoda inflata*. *J. Protozool.*, 38: 336-344.

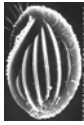




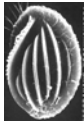
- Martín-González, A., Díaz, S. and Gutiérrez, J.C.** 1998. Encystment cortical morphogenesis, nuclear changes and resting cyst features of the marine ciliate *Euplotes rariseta*. *Microbios.*, 94: 153-165.
- Matsusaka T., Noguchi O. and Yonezawa F.** 1989. Cortical morphogenesis during encystment in a ciliate, *Euplotes encysticus* Yonezawa, 1985. *Europ. J. Protistol.*, 24: 133-137
- Matsusaka, T. and Kimura, S.** 1981. Changes in macronuclear ultrastructures during encystment in a ciliate, *Histiculus muscorum*. *Kumamoto J. Science Biol.*, 15: 49-58.
- Miao, M., Weibo, S., Z igui, C., Khaled, A. S., Chen, S., Jiamei, J. and Wenbo, G.** 2007. A unique euplotid ciliate, *Gastrocirrhus* (Protozoa, Ciliophora): assessment of its phylogenetic position inferred from the small subunit rRNA gene sequence. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 54: 371-378.
- Million, K., Larcher, J.C., Laoukili, J., Bourguignon, D., Marano, F. and Tournier, F.** 1999. Polyglutamylation and polyglycylation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulins during in vitro ciliated cell differentiation of human respiratory epithelial cells. *J. Cell. Sci.*, 112: 4357-4366.
- Olins, D.E., Olins, A.L., Robert-Nicoud, M., Jovin, T.M., Wheland, J. and Weber, K.** 1989. Differential distribution of  $\alpha$ -tubulin isotypes in *Euplotes eurystomus* determined by confocal immunofluorescence microscopy. *Biol. Cell*, 101: 2085-2094.
- Orias, E.** 1981. Probable somatic DNA rearrangements in mating type determination in *Tetrahymena thermophila*: a review and a model. *Dev. Genet.*, 3: 185-202.
- Patterson, D.J. and Sogin, M.L.** 1992. Eukaryote origins and protistan diversity in *The Origin and Evolution of Prokaryotic and Eukaryotic Cells*. Ed. H. Hartman and K. Matsuno. World Scientific Pub. Co. New York, pp. 13-46.
- Peck, R., Pelvat, B., Bolivar, I. and Haller G. de.** 1975. Light and electron microscope observation on the heterotrich ciliate *Climacostomum virens*. *J. Protozool.*, 22: 368-385.
- Penard, E.** 1922. Etudes sur les Infusoires d'eau douce. Georg et Cie. Genève.
- Philippe, H.** 1993. MUST: a computer package for management utilities for sequences and trees. *Nucleic. Acids. Res.*, 21: 5264-72.
- Prowazek, S.** 1899-1903. Protozoenstudien I.III. *Arb. Zool. Inst.*, Univ.Wien, pp. 11-14.
- Puytorac, P. de et Grain, J.** 1976. Ultrastructure du cortex buccal et évolution chez les ciliés. *Protistologica*, 12: 49-67.
- Puytorac, P. de, Batisse, A., Bohatier, J., Corliss, J.O., Deroux, G., Didier, P., Dragesco, J., Fryd-Versavel, G., Grain, J., Grolière, C-A., Hovasse, R., Iftode, F., Laval, M., Roque, M., Savoie, A. et Tuffrau, M.** 1974. Proposition d'une classification du phylum Ciliophora Doflein, 1901. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 278: 2799-2802.



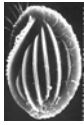
- Puytorac, P. de, Grain, J. et Mignot, J.P.** 1987. Précis de Protistologie. Boubée, Paris.
- Qu, H.L., Michot, B. and Bachellerie, J.P.** 1983. Improved methods for structure probing in large RNAs: a rapid 'heterologous' sequencing approach is coupled to the direct mapping of nuclease accessible sites. Application to the 5' terminal domain of eukaryotic 28S RNAr. *Nucl. Acids. Res.*, 11: 5903-5920.
- Raff, E.C.** 1994. The role of multiple tubulin isoforms in cellular microtubule function. En *Microtubules* (J.S. Hyams and C.W. Lloyd, eds.), pp. 85-109. Wiley-Liss, New York.
- Raikov, I.B.** 1982. The Protozoan Nucleus, Morphology and Evolution. Springer-Verlag, Viena, New York.
- Redeker, V., Levilluers, N., Schmitter, J.M., Le Caer, J.P., Rossier, J., Adoutte, A. and Bré, M.H.** 1994. Polyglycylation of tubulin: a posttranslation modification in axonemal microtubules. *Science*, 266: 1688-1691.
- Riley, L. and Katz, L.** 2001. Widespread distribution of extensive chromosomal fragmentation in ciliates. *Mol. Biol. Evol.*, 18: 1372-1377.
- Rios, R.M., Torres, A., Calvo, P. and Fedriani, C.** 1985. The cyst of *Urostyla grandis* (Hypotrichida: Urostylidae): Ultrastructure and evolutionary implications. *Europ. J. Protistol.*, 21: 481-485.
- Robles, J. and Doers, M.** 1994. PGEM-T vector systems troubleshooting guide. *Promega Notes* 45: 19.
- Ron, M<sup>a</sup>E., Fuertes, E., Blanco, E y Fdez -Galiano, E.** 1983. Estudio de la flora muscinal del hayedo de Montejo de la Sierra (provincia de Madrid). *Trab. Dep. Botánica*, 12: 77-93. Madrid.
- Roque, M.** 1970. Observations sur *Phacodinium metchnikoffi*, Certes, 1891. *Ann. Stat. Biol. Besse-en-Chandesse*, 5: 297-302.
- Ruffolo, J.J., Jr.** 1976. Fine structure of the dorsal bristle complex and pellicle of *Euplotes*. *J. Morphol.*, 148: 469-528.
- Ruthmann, A. and Hauser, M.** 1974. Mitosis-like macronuclear division in a ciliate. *Chromosoma*, 45: 261-272.
- Saiki, R. K.** 1990. Amplification of genomic DNA, pp 13-20. En: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds); PCR Protocols. A Guide to Methods and Amplification. Academic Press, USA.
- Saitou N. and Nei, M.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.



- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T.** 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Schlegel, M.** 1994. Molecular phylogeny of eukaryotes. *TREE* 9: 330-335.
- Sealeg, P.G. and Southern, E.M.** 1982. Electrophoresis of DNA. En: Gel Electrophoresis of Nucleic Acids. A practical approach. Rickwood, D., Hames, B.D. (eds.). IRL Press, USA. pp 39-76.
- Shin, M.K., Hwang, U.W., Kim, W., Wright, A.G., Krawczyk, C. and Lynn, D.H.** 2000. Phylogentic Position of the ciliates *Phacodinium* (Order *Phacodiniida*) and *Protocruzia* (Subclass *Protocruziidia*) and Systematics of the spirotrich ciliates examined by small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Europ. J. Protistol.*, 36: 293-302.
- Silva Neto, da I.D.** 1993. Structural and ultrastructural observations of the ciliate *Phacodinium metchnikoffi* Certes, 1891 (Heterotrichea, Phacodiniida). *Europ. J. Protistol.*, 29: 209-218.
- Silva Neto, da I.D.** 1994. Observations sur l'ultrastructure du Cilié Hétérotriche, *Licnophora auerbachii* Cohn, 1866, épibionte de l'étoile de mer. *Ann. Sci. Natur., Zoologie, Paris*, 2 (15): 49-62.
- Simpson, G.** 1961. Principles of animal taxonomy. Columbia University Press. New York.
- Small, E.B.** 1976. A proposed subohyletic division of the phylum Ciliophora Doflein, 1901. *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, 95: 739-751.
- Small, E.B. and Lynn, D.H.** 1981. A new macrosystem for the phylum Ciliophora Doflein, 1901. *BioSystems*, 14: 387-401.
- Small, E.B. and Lynn, D.H.** 1985. Illustrated Guide to the Protozoa, Eds. Lee, J.J., Hutner, S.H. y Bovee, E.C. (Soc. Protozool., Lawrence, Ks), pp. 393-575.
- Sogin, M.L.** 1994. The origin of eukaryotes and evolution into major kingdoms. En "Early Life on Earth" (S. Bengtson, Ed.). Columbia Univ. Press, New York. pp. 181-192.
- Song, W.** 1995. Morphogenetic studies on *Uronychia uncinata* (Protozoa, Ciliophora) during its asexual division. *Acta Oceanol. Sin.*, 15: 93-99.
- Song, W.** 2003. Reconsideration of the morphogenesis in the marine hypotrichous ciliate, *Aspidisca leptaspis* Fresenius, 1865 (Protozoa, Ciliophora). *Europ. J. Protistol.*, 39: 53-62.
- Song, W. und Packroff, G.** 1993. Beitrag zur Morphogenese des marinen Ciliaten *Diophrys scutum* (Dujardin, 1841) (Ciliophora, Hypotrichida), *Zool. Jb. Anat.*, 123: 85-95.
- Song, W., Wilber, N., Chen, Z.G. and Shi, X.L.** 2004. Considerations on the systematic position of *Uronychia* and related euplotids based on the data of ontogeny and 18S rRNA gene



- sequence analyses, with morphogenetic redescription of *Uronychia setigera* Calkins, 1902 (Ciliophora: Euplotida). *Acta Protozoologica*, 43: 313-328
- Steinbrück, G., Haas, I., Hellmeyer, K.H. and Ammermann, D.** 1981. Characterization of macronuclear DNA in five species of ciliates. *Chromosoma*, 83: 199-208.
- Strüder-Kypke, M.C. and Lynn, D.H.** 2003. Sequence analyses of the small subunit rRNA gene confirm the paraphyly of oligotrich ciliates sensu lato and support the monophyly of the subclasses Oligotrichia and Choreotrichia (Ciliophora, Spirotrichea). *J. Zool. Lond.*, 260: 87-97.
- Sullivan, K.F.** 1988. Structure and utilization of tubulin isotypes. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 4: 687-716.
- Swofford, D.L.** 1998. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Sunderland, MA: Sinauer.
- Thompson, A.S., Rhodes, J.C. and Pettman, I.** 1988. CCAP Catalogue of strains. Gran Bretaña.
- Tuffrau, M.** (1986'87). Proposition d'une classification nouvelles de l'Ordre Hypotrichida (Protozoa, Ciliophora), fondée sur quelques données récentes. *Ann. Sc. Nat. Zool.*, 12 série, 8:11-117.
- Tuffrau, M., Pyne, C.K. et de Haller, G.** 1968. Organization de l'infaciliature chez quelques ciliés hypotriches. *Protistologica*, 4: 289-301.
- Walker, G.K. and Hoffman, J.T.** 1985. An ultrastructural examination of cyst structure in the hypotrich ciliate *Gonostomun* sp. *Cytobios.*, 44: 153-161.
- Walker, G.K., Maugel, T. and Goode, D.** 1975. Some ultrastructural observations on encystment in *Stylonychia mytilus* (Ciliophora: Hypotrichida). *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, 94: 147-154.
- Walker, G.K. and Maugel, T.K.** 1976. An ultrastructural investigation of encystment in hypotrich ciliates. *J. Protozool.*, 23: 21A.
- Walker, G.K. and Maugel, T.K.** 1980. Encystment and excystment in hypotrich ciliates. II. *Diophrys scutum* and remarks on comparative features. *Europ. J. Protistol.*, 16: 525-531.
- Walker, G.K., Maugel, T. and Goode, D.** 1980. Encystment and excystment in hipotrich ciliates. I. *Gastrostyla steinii*. *Europ. J. Protistol.*, 16: 511-524.
- Wheland, J., Willingham, M.C. and Sandoval, I.V.** 1983. A rat monoclonal antibody reacting specifically with the tyrosylated form of  $\alpha$ -tubulin. I. Biochemical characterization, effects on microtubule polymerization in vitro, and microtubule polymerization and organization in vivo. *J. Cell. Biol.*, 97: 1467-1475.



- Wicklowsky, B.J.** 1983. Ultrastructure and cortical morphogenesis in the Euplotine Hypotrich *Certesius quadrinucleatus* Fabre-Domergue, 1985 (Ciliophora, Protozoa). *J. Protozool.*, 30: 256-266.
- Woese, C.R.** 1994. There must be a prokaryote somewhere: Microbiology's search for itself. *Microbiol. Rev.*, 58:1-9.
- Woese, C. R., Kandler, O. and Wheelis, M.L.** 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains archaea, bacteria and eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87: 4576-79.
- Wolff, A., de Néchaud, B., Chillet, D., Mazarguil, H., Desbruyères, E., Audebert, S., Eddé, B., Gros, F. and Denoulet, P.** 1992. Distribution of glutamylated  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin in mouse tissues using a specific monoclonal antibody, GT335. *Eur. J. Cell. Biol.*, 59: 425-432.
- Xia, L., Hai, B., Gao, Y., Burnette, D., Thazhath, R., Duan, J., Bré, M.H., Levilliers, N., Gorovsky, M.A. and Gaertig, J.** 2000. Polyglycylation of tubulin is essential and affects cell motility and division in *Tetrahymena thermophila*. *J. Cell. Biol.*, 149: 1097-1106.
- Yao, M.-C. and Gall, J.G.** 1979. Alteration of the *Tetrahymena* genome during nuclear differentiation. *J. Protozool.*, 26: 10-13.